

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Marcadores moleculares asociados a Plasmodium
falciparum resistente a sulfadoxina-pirimetamina en
las localidades de Caballococha y Padre Cocha, región
Loreto, Perú**

TESIS

para optar el grado académico de Magíster en Bioquímica

AUTOR

Carola Janette Salas Hermoza

ASESOR

Mario Monteghirfo Gomero

Lima – Perú

2007

ASESOR

Mg. Mario Monteghirfo Gomero
Profesor Asociado
Instituto de Investigación de Bioquímica y Nutrición
Facultad de Medicina - U.N.M.S.M.

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente: Dr. Ernesto Ráez

MIEMBROS

Mg. Mario Monteghirfo Gomero
Mg. Doris Huerta
Mg. Ines Arnao

DEDICATORIA

A mis amados padres Félix y Narcisa, por la dedicación y amor con el que me educaron, por la personalidad que en mi forjaron, por ser la motivación para mi superación profesional y personal.

A mis hermanos Félix y Olenka, por acompañarme y apoyarme en mis proyectos, por tener fe en vuestra hermana mayor.

A mis supervisores

Dr. Alan Magill, M.D.

Dr. Trenton Ruebush, M.D.

Dr David Bacon, Ph.D.

*Por brindarme la oportunidad de
desarrollar investigacion en el Perú.*

Al Centro de Investigación de

*Enfermedades Tropicales de la Marina de
los Estados Unidos – NMRCDC, por hacer
posible el desarrollo de esta tesis y por el
financiamiento otorgado a través del fondo
DoD/GEIS.*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación es el resultado de largas horas de estudio, lectura incansable, pero sobre todo vision para iniciar los estudios de post-grado y fuerza de voluntad para culminarlos.

Muchas personas participaron en este esfuerzo, en el aspecto académico a mis maestros del Instituto de Bioquímica de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos: los Magísteres Raquel Oré, Doris Huerta, Inés Arnao, Silvia Suárez, las Doctoras Patricia Woll y Mercedes Soberón por sus criticas constructivas en la elaboración de los borradores iniciales de la tesis, y al Mg. Mario Monteghirfo el asesor del trabajo final.

Así mismo debo expresar mi agradecimiento a los Doctores Alan Magill y Trenton Ruebush por darme la gran oportunidad de trabajar primero en las investigaciones clínicas de malaria que han sido realizadas en el Perú por el US NMRCDC desde 1997, y que me han permitido ser testigo de los cambios realizados en las políticas de tratamiento de malaria en el Perú, además por confiarme el desarrollo inicial de pruebas de biología molecular en el laboratorio de Parasitología del NAMRID. Así mismo al PhD David Bacon, a quien debo muchos de mis conocimientos de biología molecular y la culminación de este trabajo de investigación.

Al Mg.Christian Bautista por traducir mis ideas en un modelo estadístico y realizar el análisis de los datos.

A mi supervisora y amiga, Mg Carmen Lucas, por animarme a culminar esta aventura y por confiar en mi buen juicio para redactar.

A mis colegas Gladys Carrión, Vidal Felices, Merly Sovero y Christopher Cruz, compañeros de mis incertidumbres iniciales en el desarrollo de este proyecto y que siempre supieron darme una luz para resolver problemas técnicos.

ABREVIATURAS

AS : Artesunato

AS-MQ: Combinación Artesunato-Mefloquina

BR : Repetición Bolivia

CD : Cloproguanil-dapsona

CQ : Cloroquina

DHFR : Dihidrofolato reductasa

DHPS : Dihidropteroato sintasa

FCT: Falla Clínica Tardía

FTP : Falla Terapéutica Temprana

FTT : Falla Terapéutica Tardía

IC : Intervalo de Confianza

MQ : Mefloquina

OGE : Oficina General de Epidemiología

WHO/OMS: Organización Mundial de la Salud

OR : Razón de desigualdad (Odds ratio)

P.f. : *Plasmodium falciparum*

P.v. : *Plasmodium vivax*

PABA : Acido *p*-amino benzoico

PCR : Reacción en cadena de la polimerasa

Pfcr : Gen del transportador de cloroquina de *P. falciparum*

Pfdhfr : Gen dihidrofolato reductasa de *Plasmodium falciparum*

Pfdhps : Gen dihidropteroato sintasa de *Plasmodium falciparum*

Pfmdr1 : Gen de multiresistencia de *Plasmodium falciparum*

RPCA : Respuesta Clínica Parasitológica Adecuada

RENACE : Red nacional de Epidemiología

RFLP : Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción

RI : Resistencia Parasitológica tipo I

RII : Resistencia Parasitológica tipo II

RII: Resistencia Parasitológica tipo III

SP : Sulfadoxina-pirimetamina

TCA : Terapia de Combinación-Basada en Artemisina

bp: Pares de bases

CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
III OBJETIVOS.....	15
IV. MATERIALES Y METODOS	16
V. RESULTADOS	25
VI. DISCUSION	38
VII CONCLUSIONES.....	52
VIII. RECOMENDACIONES	53
IX. BIBLIOGRAFIA	54
X. ANEXOS	64

RESUMEN

El objetivo de esta investigación retrospectiva, fue determinar la asociación existente entre mutaciones puntuales en los genes dihidrofolato reductasa (*Pfdhfr*) y dihidropteroato sintasa (*Pfdhps*) de *Plasmodium falciparum* y la respuesta clínica en pacientes con diagnóstico de malaria no complicada causada por *P. falciparum*, admitidos en un estudio de eficacia *in vivo* de sulfadoxina-pirimetamina (SP) llevado a cabo en dos áreas de la región Loreto en 1999. Se tomaron muestras de sangre de 86 pacientes antes de administrarles SP, las que se analizaron usando PCR-anclado específico de alelo para estudiar a los codones S108N/T, N51I, C59R, I164L y C50R del gen *Pfdhfr* y los codones A436G, A437G, K540E, A581G y A613S/T del gen *Pfdhps*, encontrándose que las infecciones causadas por parásitos con 3 mutaciones en *Pfdhfr* (108Asn/51Ile/164Leu) y 2 (581Gli/437Gli) ó 3 mutaciones en *Pfdhps* (581Gli/437Gli/540Glu) denominados el quintuple mutante y el séxtuple mutante, respectivamente, se encontraban asociadas con la falla del tratamiento con SP. Además, se estableció que cuanto más alto era el número de mutaciones tanto en *Pfdhfr* como en *Pfdhps*, más alto era el riesgo de fallar al tratamiento con SP, según resultado del análisis de regresión logística empleado para asociar a estas dos variables. Este estudio contribuye en brindar evidencias científicas de la asociación existente entre las variables en la región Loreto contribuyendo a su validación y su futuro uso para estudios de vigilancia de fármaco resistencia a SP no solo en el Perú sino en general para los países de América del Sur que comparten territorio de la selva Amazónica.

ABSTRACT

The objective of this retrospective study was to determine the association between point mutations in dihydrofolate reductase (*Pfdhfr*) and dihydropteroate synthase (*Pfdhps*) *Plasmodium falciparum* genes, and clinical outcome of patients with non complicated *P.falciparum* malaria diagnosis, admitted to a *in vivo* sulphadoxine-pyrimethamine (SP) drug efficacy study conducted in 1999, in two areas of Loreto region. We used allelic specific-nested PCR to analyze 86 blood samples collected before SP treatment, and study mutations at codons S108N/T, N51I, C59R, I164L and C50R in *Pfdhfr* and codons A436G, A437G, K540E, A581G y A613S/T in *Pfdhps* genes, and found that Infections caused by parasites harbouring 3 mutations in *Pfdhfr* (108Asn/51Ile/164Leu) and either 2 or 3 mutations in *Pfdhps* (581Gly/437Gly and 540Glu) called the quintuple and sextuple mutants, respectively, were associated to failure with SP treatment. Logistic regression analysis was used to look for association between the variables, helping to establish the higher the number of mutations in both *Pfdhfr* and *Pfdhps* genes, the higher the risk of treatment failures when using SP. The contribution of this study is to provide scientific evidences of the association between both variables in Loreto region supporting its validation and future application in surveillance studies for SP drug resistance, that can be conducted not only in Peru but also in South American countries that share the Amazon basin territory.

I. INTRODUCCIÓN

Cuatro especies de *Plasmodium* causan malaria en humanos: *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*, estos tienen un ciclo de vida complejo que involucra a un hospedero vertebrado (humano) y a uno invertebrado (zancudo *Anopheles*) (Anexo N° 1).

Malaria es una de las infecciones parasitarias más importantes en el mundo, es un problema de salud pública que ocasiona de 300 a 500 millones de casos clínicos por año. Aproximadamente 90% de las manifestaciones clínicas manifestadas, y prácticamente todas las muertes atribuidas a malaria, son causadas por *P. falciparum*. El segundo en importancia es *P. vivax*, que es responsable del 10% restante de la incidencia global de malaria. De todos estos casos, un 90% suceden en África tropical, un 9% en Asia y el oeste de Oceanía, casi un 1% en Centro y Sur América; la población más vulnerable incluye a niños pequeños, mujeres gestantes y visitantes no inmunes que llegan a áreas endémicas (79).

La terapia antimalárica es la principal arma para combatir esta infección ya que a pesar de haber pasado más de tres décadas desde que se demostró por primera vez que los esporozoitos irradiados eran capaces de inducir respuesta inmune (11), a la fecha aun no ha sido posible desarrollar una vacuna efectiva contra la malaria (3,37). No solo son pocos los medicamentos antimaláricos disponibles, sino que la situación de la población en riesgo empeora frente al surgimiento de la fármaco resistencia, que ha sido identificada en *P. falciparum* y *P. vivax* (5).

La OMS define a la “fármaco resistencia a antimaláricos” como : la habilidad de una cepa de parásito para sobrevivir y/o multiplicarse a pesar de la administración y absorción de un medicamento administrado en dosis iguales a y aun mayores a aquellas usualmente recomendadas pero dentro de la tolerancia del sujeto, con el requerimiento de que la forma de la droga activa contra el parásito debe ser capaz de ganar acceso al parásito o al glóbulo rojo

infectado por la duración del tiempo necesario para su acción normal (89).

Es de particular interés la aparición y dispersión de la resistencia a cloroquina (CQ), una 4-aminoquinolina que era efectiva hasta finales de los 1950s, que luego dio paso al uso de una combinación de antifolatos: sulfadoxina-pirimetamina (SP) o Fansidar® (48,53), ambas drogas se caracterizaron inicialmente por su rápida eficacia, seguridad de uso, y costo adecuado, tan bajo que llegaban hasta 10 a 20 centavos de dólar por régimen de tratamiento (64). A la fecha con la excepción de América Central y México, todas las áreas donde malaria es autóctona son resistentes a CQ, mientras que la resistencia a SP se ha difundido hasta áreas del Sud-Este Asiático, llegando rápido al África.

La compleja biología del Plasmodium es un factor importante que contribuye a empeorar el problema de la dispersión e intensificación de la fármaco resistencia a drogas antimaláricas ya que las cepas de *P. falciparum* han desarrollado resistencia a múltiples drogas y pocos agentes antimaláricos permanecen efectivos. Este es un hecho que alcanza a América del Sur, donde se ha comprobado la existencia de altos niveles de resistencia tanto a CQ, como a la combinación SP específicamente en la cuenca Amazónica, donde la resistencia a CQ se ha dispersado, siendo el principal problema ante la resistencia el alto costo de las terapias alternativas a CQ, lo que las hacen inalcanzables para los ministerios de salud de los países donde malaria es una enfermedad endémica (61).

La aparición de la resistencia a CQ impulsó el desarrollo de métodos para la determinación de la fármaco sensibilidad/resistencia de *P.falciparum*, estos estaban inicialmente limitados a la evaluación parasitológica de la respuesta *in vivo*, seguido del desarrollo posterior de los métodos *in vitro* (87,40) y los métodos de genotipificación.

Se sabe de que la resistencia a medicamentos antimaláricos y otras funciones vitales de los Plasmodium están genéticamente determinados, y por lo tanto pueden ser estudiados por técnicas de biología molecular, así en las

últimas dos décadas el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el secuenciamiento han permitido identificar varios marcadores de resistencia a antimaláricos. Con respecto a SP, la atención esta enfocada a la caracterización molecular de los genes dihidrofolato reductasa (*Pfdhfr*) y dihidropteroato sintasa (*Pfdhps*) de *Plasmodium falciparum* y la asociación existente entre mutaciones puntuales y la resistencia a pirimetamina y sulfadoxina, respectivamente. Ambos genes presentan polimorfismos variables dependiendo de la ubicación geográfica donde son estudiados, la presión del uso de SP, el movimiento migratorio de habitantes entre áreas endémicas, y presencia de vectores de la infección así como de los aspectos inmunológicos de la población en estudio (30).

El objetivo de este estudio fue demostrar la existencia de asociación entre el patrón de mutaciones en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps* y la respuesta *in vivo* al tratamiento con SP, en aislamientos de *P. f.* tanto resistentes como sensibles a este tratamiento, usando para este fin uno de los tres tipos de análisis multivariado que es la regresión logística.

II. ANTECEDENTES

Entre 1992 y 1997, los casos de malaria en la región Loreto se incrementaron en 50 veces, alcanzando 158,115 casos, en ese entonces Perú fue el segundo país con más casos de malaria después de Brasil en América del Sur, debido principalmente a fenómenos climáticos relacionados al fenómeno del Niño (2). En el año 2004, la Oficina General de Epidemiología (OGE) del Perú registró un total de 81,697 casos de malaria notificados a nivel nacional, que representan un incremento del 2% con respecto al número de casos notificados el año 2003. El 84% de los casos de malaria, notificados por la Red Nacional de Epidemiología (RENACE) durante el año 2004, fueron casos de malaria por *P. vivax*. En 1999 los casos de malaria vivax representaron el 57% de la malaria total notificada en nuestro país. La razón vivax/falciparum, se ha incrementado de 1,4 a 5 en el período transcurrido entre 1999 a 2004 (6).

En el Perú, el mayor número de casos de malaria son reportados de dos grandes ambientes epidemiológicos separados por los Andes: la cuenca Amazónica y la costa Norte del Océano Pacífico, ambas regiones reportan más del 85% de todas las infecciones de malaria en el país, y más del 95% de las infecciones por *P. falciparum* reportadas anualmente. El principal vector en la región Amazónica es *Anopheles darlingi*, y en la costa Norte es *Anopheles albimanus* (8, 16).

Hasta principios de la década de 1990, CQ era el medicamento de elección para el tratamiento de malaria no complicada causada por *P. falciparum* en todas las zonas endémicas del país, hasta que se observó que la incidencia de malaria causada por *P. falciparum* en la región Amazónica del Perú se había incrementado en aproximadamente 50 veces, debido principalmente a factores climáticos involucrados con el fenómeno del Niño, también por el incremento de la presencia de *Anopheles darlingi*, el principal vector de *P. falciparum* en la Amazonía de Brasil (2), y como consecuencia, la malaria resistente a CQ y a la combinación SP, Fansidar® es ahora predominante en esta región.

Existen dos métodos para la evaluación de la sensibilidad de *P. falciparum* a medicamentos antimaláricos el primero y en cuyos resultados se basan los programas nacionales de malaria para formular cambios en las políticas de tratamiento son los estudios de eficacia *in vivo*, que fueron diseñados en 1965, poco tiempo después de la emergencia de la resistencia a CQ, estos protocolos han sido revisados y modificados y la última versión disponible fue emitida en 2003 (86).

En general la eficacia terapéutica se caracteriza por una temprana reducción de la densidad parasitaria seguido de una ausencia de fiebre en presencia de una infección recurrente, y se clasifica como: respuesta clínica adecuada, falla terapéutica temprana, y falla terapéutica tardía. Una infección recurrente o persistente pero sin fiebre es considerada como una respuesta clínica adecuada. En cambio la resistencia parasitológica que se clasifica en sensible (S) y tres diferentes grados de resistencia (RI, RII, RIII) en los que sólo se considera la presencia, ausencia y el nivel de densidad parasitaria sin considerar los factores clínicos como la fiebre o los signos de malaria severa. En general, existe un alto grado de concordancia entre ambos métodos (50, 82).

Numerosos estudios de eficacia *in vivo* han sido conducidos en áreas endémicas del Perú, con la finalidad de documentar el patrón de resistencia de *P. falciparum* frente a estos medicamentos antimaláricos (61), tomando en cuenta que los resultados de las pruebas terapéuticas son la base para la toma de decisiones en las políticas de tratamiento de los programas nacionales de malaria (85). En la región Amazónica se encontraron altos niveles de resistencia (mayor de 50% RII/RIII) tanto a CQ y SP (31,69,32), como consecuencia se ha dejado de usar estos medicamentos antimaláricos para el tratamiento de primera línea de esta infección parasitaria. Estudios similares han demostrado una resistencia del orden de más del 50% RII/RIII a CQ pero una resistencia menor del 5% RII/RIII a SP mas no resistencia a mefloquina (MQ) en tres lugares ubicados en la costa Norte del Perú (35). Por otro lado, no se encontró resistencia a MQ ni la combinación mefloquina-artesunato (MQ-

AS) en la región Amazónica (34).

Finalmente, basado en los resultados obtenidos en estos estudios de eficacia *in vivo*, el Ministerio de Salud del Perú decidió optar por dos terapias de combinación, SP-AS para ser usado en la costa Norte del Perú, y MQ-AS para ser usado en la cuenca Amazónica (36, 39, 61).

Otros métodos que pueden ser usados para determinar la susceptibilidad de *P.f.* a los antimaláricos son las pruebas *in vitro* (40). La OMS refiere que los ensayos para determinar la sensibilidad *in vitro* pueden ser usados para medir la sensibilidad intrínseca de *P.f.*, sin la interferencia de los factores que causan confusión por parte del hospedero al ejecutarse las pruebas *in vivo*.

Estos ensayos están basados en el cultivo de aislamientos de *P.f.* que son expuestos a un rango de concentración de antimaláricos precisamente conocida y el recuento del número de parásitos para determinar la inhibición de la maduración hacia el estadio de esquizontes. Existen varios métodos *in vitro*, los que varían principalmente es la forma en que se interpretan los resultados, estos incluyen dos pruebas clásicas (87).

(1) el examen microscópico de láminas con gotas gruesas para la prueba de la microplaca de OMS (Rieckman, 1968), o el llamado “WHO Mark III test”.

(2) la micro prueba isotópica (Desjardins, 1979), es un ensayo de susceptibilidad basado en la medición de la incorporación de un precursor del ADN: la hipoxantina, marcada con un radioisótopo; este método es aplicado sobre todo para el tamizaje de compuestos candidatos a ser medicamentos antimaláricos. Se deduce que existe resistencia frente a un medicamento cuando el crecimiento del parásito no es inhibido a una concentración umbral establecido.

De otro lado tenemos nuevas pruebas que basan sus sistemas de detección en ensayos con ELISA que usan:

(a) anticuerpos dirigidos ya sea contra la enzima pLDH (Lactato

Deshidrogenasa de Plasmodium) o

(b) contra la proteína rica en histidina II (HRP-II).

Todas estas pruebas difieren en los puntos finales (morfología del esquizonte, con por lo menos 3 núcleos, período fijo de incubación, una densidad óptica arbitraria aplicada en la lectura de los pozos controles) y también en el tipo de metabolito involucrado en la medición (incorporación de un precursor de nucleótidos, producción de una enzima específica del parásito o secreción de un antígeno soluble).

El objetivo general de las pruebas *in vitro* es monitorizar la fármaco resistencia en un país o en una región. Además están indicadas en monitorización epidemiológica con la finalidad de determinar patrones de resistencia cruzada, para establecer líneas de partida de sensibilidad de una droga antes de su uso y también para monitorizar la susceptibilidad temporal y espacial de las drogas (17). En el Perú, se ha utilizado la prueba de la micro placa de OMS, ejecutada por personal experto del Instituto Nacional de Salud (21).

Otro aspecto en el que la O.M.S. esta enfocado es en pruebas de genotipificación, tomando en consideración a los recientes avances en biología molecular que ha hecho posible la identificación de marcadores moleculares que están asociados a la resistencia de *P.f* a ciertos antimaláricos. A la fecha son cinco los genes que han atraído el interés en la lucha por dilucidar los polimorfismos relacionados a fármaco resistencia a drogas antimaláricas y que podrían servir como marcadores moleculares específicos:

- a) Pirimetamina y cicloguanil: asociadas al gen dihidrofolato reductasa (*Pfdhfr*).
- b) Sulfonamidas: asociadas al gen dihidropteroato sintasa (*Pfdhps*).
- c) Cloroquina: resistencia atribuida a polimorfismos en el transportador de resistencia de CQ de *P.f*. (*Pfcr1*) (13,18).
- d) El cuarto gen es de multiresistencia 1 de *P. f*. (*Pfmdr1*) que se cree juega un rol en la modulación de resistencia a compuestos del tipo 4-quinolinametanoles, 4-aminoquinolinas y otros compuestos (54, 71).

- e) Se ha demostrado que una mutación en el gen Citocromo b, (Y268N o Y268S), puede estar ligada a la resistencia *in vitro* a Autovacuona especialmente cuando es usada en monoterapia, provocando un incremento de 10,000 veces el IC₅₀ de la droga, aunque su rol es todavía controversial (80, 87).

La mayoría de las mutaciones mencionadas fueron identificadas en cepas de *P.f.* de referencia y validadas subsecuentemente por pruebas *in vitro* usando aislamientos de pacientes. Estos estudios han permitido determinar la correlación existente entre los datos *in vitro* y los marcadores moleculares. Por lo tanto, los marcadores moleculares pueden reemplazar a los ensayos *in vitro* bajo ciertas circunstancias. Existe un interés particular en el estudio de drogas que demandan condiciones *in vitro* muy exigentes o cuyos resultados son difíciles de reproducir (pirimetamina, cicloguanil, sulfadoxina).

De otro lado existen los marcadores moleculares de recrudescencia y reinfección, útiles cuando la monitorización de un estudio va más allá de 14 días y como la mayoría de medicamentos antimaláricos no tienen acción en los estadios hepáticos de *P. f.*, se hace necesario distinguir los casos de infecciones nuevas de las recrudescencias sobre todo en áreas de alta transmisión. Son tres los genes los que se analizan por medio del PCR para determinar la diversidad genética de *P. falciparum*: las proteínas de superficie de merozoito 1, y 2 (*msp-1* y *msp-2*, y la proteína rica en glutamato (*glurp*)(87).

Retomando el tema de los marcadores moleculares asociados a fármaco resistencia a antimaláricos, analizaremos con algún detalle a los medicamentos antimaláricos del tipo antifolatos: pirimetamina y sulfonamidas.

- 1) Pirimetamina, un antifolato tipo 2 como trimetoprim, es un inhibidor competitivo de dihidrofolato reductasa (DHFR; EC1.5.1.3). En *P.falciparum*, DHFR es un dominio de una proteína bifuncional que también contiene a timidilato sintasa (TS; EC2.1.1.45). DHFR es una enzima clave en el ciclo redox para la producción de tetrahidrofolato, un cofactor que es requerido para la transferencia de unidades de C1

usados en la biosíntesis del DNA y de las proteínas.

- 2) Sulfadoxina, un antifolato tipo 1, inhibe a dihidropteroato sintasa (DHPS; EC2.5.1.15), una enzima clave en la biosíntesis de folato. En *P. falciparum*, DHPS es el dominio C-terminal de una proteína bifuncional combinada con 7,8-dihidro-6-hidroximetilpterin pirofosfokinasa (EC 2.7.6.3). Las sulfonamidas y las sulfonas son análogos del ácido p-amino benzoico y actúan como inhibidores competitivos de DHPS.

Hace tiempo que se ha reconocido que los antifolatos tipo 1 y 2 usados en combinación para tratar malaria demuestran un efecto sinérgico, una característica que le permite ser efectivo contra *Plasmodium*, ya que la síntesis de tetrahidrofolato es inhibida y las fuentes de este cofactor esencial son consumidas, interrumpiendo de esta forma a la síntesis de dTMP y metionina, logrando la muerte del parásito, por lo tanto cuando cualquiera de los componentes se ve afectado entonces la efectividad se ve dramáticamente reducida (65,78).

Se ha demostrado que las mutaciones puntuales en DHFR, que resultan en afinidades disminuidas de la droga unida a la enzima, son la causa principal de la fármaco resistencia (19,45). Las mutaciones implicadas se encuentran en los codones: 16, 50, 51, 59, 108 y 164 (20, 44, 49) y al parecer se habrían originado en Asia habiéndose dispersado al África (55). Estas mutaciones, (Figura N°1) que resultan en una pérdida de las afinidades de unión de la enzima al inhibidor, por lo general correlacionan con altos niveles de resistencia *in vitro*. De forma natural, la actividad catalítica de la enzima, aunque afectada, puede aun ser retenida a un nivel suficiente para mantener al parásito viable. La actividad en la presencia de las mutaciones puede ser rescatada por otros cambios genéticos, por ejemplo, una inserción de 5 amino ácidos después del codón 30 o “repetición Bolivia”, una repetición de los 5 aminoácidos precedentes y que se observa en áreas con alta resistencia a SP (Brasil, Perú, Bolivia), que se cree compensan por la pérdida de la eficiencia de la enzima provocada por las otras mutaciones que causaron la resistencia (10).

Figura N°1 : Polimorfismos reportados en los genes dihidrofolato reductasa (*Pfdhfr*) y dihidropteroato sintasa (*Pfdhps*) de *Plasmodium falciparum*

Codón	Modificación: "silvestre" a mutante	Asociación con Resistencia
<i>Pfdhfr</i>		
16	Alanina→Valina	Probablemente modula resistencia a cicloguanil
50	Cisteína→Arginina	Probablemente modula resistencia a pirimetamina
51	Asparagina→Isoleucina	Modula el nivel de resistencia a pirimetamina
59	Cisteína→Arginina	Modula el nivel de resistencia a pirimetamina
108	Serina→Asparagina	Fuerte determinante de resistencia a pirimetamina
	Serina→Treonina	También confiere resistencia a cicloguanil
164	Isoleucina→Leucina	Fuerte determinante de resistencia a pirimetamina
<i>Pfdhps</i>		
436	Serina→Alanina	Incrementa la resistencia a sulfas
	Serina→Fenilalanina	Modula la resistencia a sulfas
437	Alanina→Glicina	Fuerte determinante de resistencia a sulfas
540	Lisina→Acido Glutámico	Incrementa la resistencia a sulfas
581	Alanina→Glicina	Fuerte determinante de resistencia a sulfas
613	Alanina→Serina	Incrementa la resistencia a sulfas (<i>in vitro</i>)

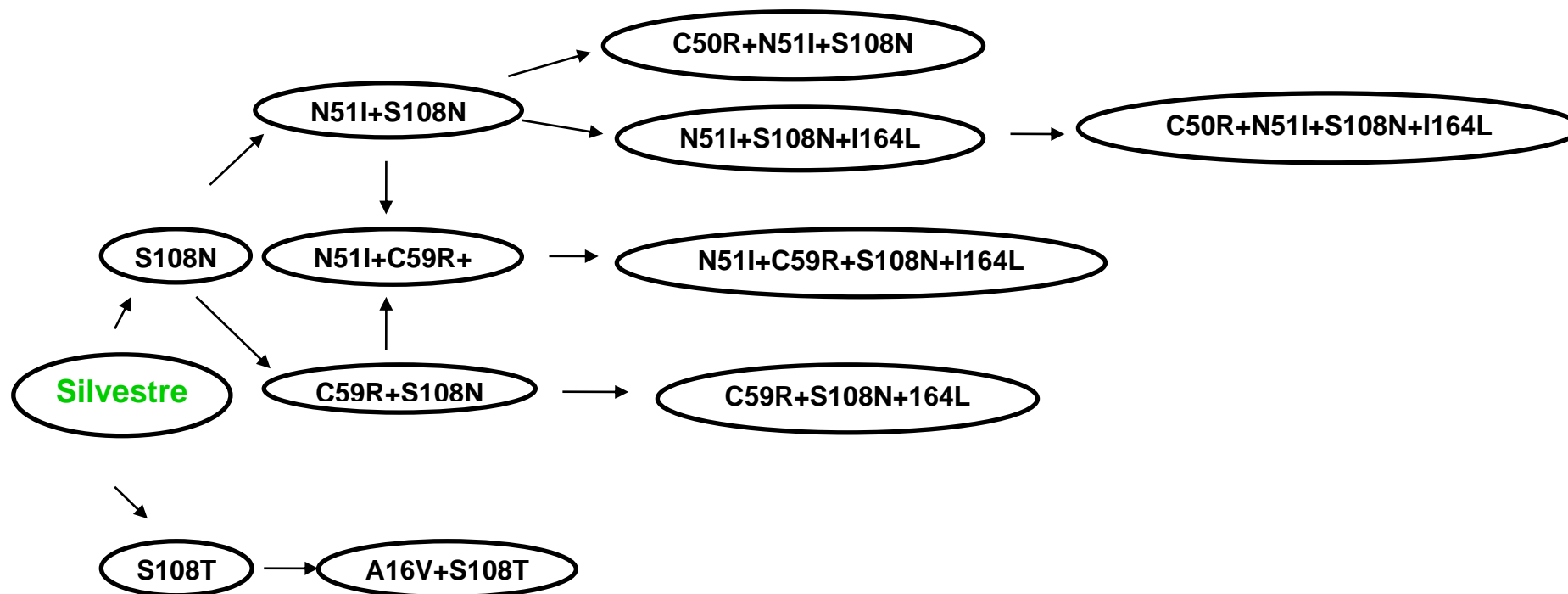
Fuente: Wernsdorfer W., Noedl H, *Molecular markers for drug resistance in malaria: use in treatment, diagnosis and epidemiology.*, *Curr Opin Infect Dis* 16:553-558, 2003(75)

Se considera que la primera mutación es Asn108 seguido por otras

mutaciones que confieren altos niveles de resistencia (Figura N°2). El cuádruple mutante resistente a pirimetamina y cicloguanil: Ile51/Arg59/Asn108 /Leu164, se encuentra en el Sud Este Asiático, mientras que Arg50/Ile51 /Asn108/Leu164 puede estar presente en bajos niveles en África. En América del Sur se ha reportado el triple mutante Ile51/Asn108 /Leu164, en áreas de alta resistencia a SP (Brasil, Bolivia y Perú). De otro lado se sabe que las mutaciones asociadas a resistencia *in vitro* a cicloguanil son dos cambios: de S108N y A16V, aunque el parásito conserva intacta su sensibilidad a pirimetamina (19, 20).

Las investigaciones de las variaciones de las secuencias entre aislamientos sensibles y resistentes a sulfonamidas reportaron 4 cambios de aminoácidos en regiones de DHPS altamente conservadas, lo que sugería que estas mutaciones estaban involucradas en la resistencia a drogas (72). Otro grupo de investigadores examinaron la secuencia del gen y encontraron que 5 mutaciones, las que afectaban 4 codones diferentes: 436, 437, 581, y 613 (7). Se encontraron niveles más altos de resistencia en aislamientos que tenían los alelos mutantes S436F y A613S/T o bien solo un alelo mutante A581G. La posición 581 descansa dentro de una región de la proteína que es modificada por las bacterias resistentes a sulfonamida, lo que sugiere un rol clave en la resistencia sulfonamida (7). De manera interesante, inicialmente se consideró que Gli437 no estaba ligada significativamente a la resistencia en estos estudios *in vitro*. Los primeros aislamientos de campo en los que se identificó una mutación de lisina a glutamato en posición 540 (K540E) fueron descritos en 1997 (49,73), esta mutación ocurrió solo en asociación con Gli437. La mutación trimorfica en posición 613 fue confirmada en aislamientos de campo provenientes de Kenia para codificar ya sea alanina (tipo salvaje), treonina, o serina (mutantes), según fue previamente descrito (7,42). La mutación en el codón 436 ha generado controversia, ya que algunos autores han sugerido que los polimorfismos en 436(S436A/F), son tipos salvajes alternativos (42), mientras que otros consideran que esta puede contribuir a un nivel bajo de fármaco resistencia (7,73).

Figura N° 2: Hipótesis de la Evolución de la Resistencia a Antifolatos a través de Acumulación de Mutaciones



Se considera que la primera mutación es S108N, seguida por otras mutaciones que confieren niveles elevados de resistencia. El cuádruple mutante N51I+C59R+S108N+I164L, resistente tanto a pirimetamina como cicloguanil es hallado en el sud este Asiático, mientras que C50R+N51I+S108N+I164L podría estar presente en bajos niveles. Otro mutante A16V+S108T es resistente solo a cicloguanil no a pirimetamina. (Uhlenmann et al, Mechanisms of Antimalarial Drug Action and Resistance: Molecular Approaches to Malaria, edited by I. Sherman, ASM, 2005)(64).

Existen reportes de estudios de prevalencia de marcadores moleculares en el Perú, que son valiosos por haber usado muestras provenientes de estudios de eficacia *in vivo*, uno de estos se refiere a prevalencia de mutaciones puntuales en el gen de multiresistencia de *P. falciparum* (*Pfmdr1*), codones S1034C, N1042D y D1246Y, en una cohorte de pacientes en la que se comparó la eficacia *in vivo* de MQ vs MQ-artesunato (47), y en el que no se encontró asociación significativa entre ambos estudios.

Otro estudio de mutaciones en los genes: *Pfmdr1* y *Pfcrt* en asociación a pruebas de susceptibilidad *in vitro* en la localidad de Padre Cocha, región Loreto (23), en el que se encontró alta resistencia a CQ, susceptibilidad disminuida a quinina, y sensibilidad a MQ, de otro lado no encontraron mutaciones en los codones el N86Y y D1246Y, de *Pfmdr1*, dos de las 5 mutaciones más comunes halladas en este gen en muestras resistentes a CQ, además concluyeron que la mutación K76T en *Pfcrt*, estaba presente en todos los aislamientos.

Los datos preliminares sobre polimorfismos en *Pfdhfr/Pfdhps* de la región Loreto datan de 1998, cuando Kublin et al (26), secuenciaron muestras recolectadas como parte de un estudio de eficacia *in vivo* a SP en población pediátrica y encontraron polimorfismos en *Pfdhfr* en los codones 108, 51 y 164 además de la inserción “repetición Bolivia” (BR) así como polimorfismos en los codones 437, 540, 581.

Existen dos trabajos de investigación no publicados sobre prevalencia de polimorfismos en *Pfdhfr* y *Pfdhps*, en los que se utilizaron alicotas de sangre colectas como parte de estudios de eficacia a SP. El primero, llevado a cabo en la Costa Norte del Perú (35) que reveló tasas de prevalencia del alelo mutante Asn108 en el gen *Pfdhfr* de más del 70%, sin mutaciones en *Pfdhps* (C. Salas, datos no publicados).

El segundo grupo de muestras provenía de estudios de eficacia *in vivo* conducidos en Pampa Hermosa/Alianza en el 2000 y en Ullpayacu en el 2002; dos áreas endémicas de la selva Oeste de Loreto, en los que se confirmó la

persistencia de resistencia a CQ y la sensibilidad de SP (14). Respecto a los polimorfismos en *Pfdhfr/Pfdhps*, se encontró que en Pampa Hermosa/Alianza solo estaba presente el alelo *Pfdhfr* Asn108 en un 13% de las muestras, mientras el 100% de las muestras de Ullpayacu presentaban este alelo en el año 2002 (Salas C, datos no publicados), también se determinó que el resto de los codones estudiados (50, 51, 164, 436/437, 540, 581 y 613) eran silvestres.

III OBJETIVOS

Objetivo General:

Establecer la asociación existente entre el patrón de mutaciones en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps* de *Plasmodium falciparum* y la respuesta *in vivo* al tratamiento con SP, en aislamientos de *P. f.* tanto resistentes como sensibles a esta terapia antimalárica.

Objetivos Específicos:

1. Determinar el patrón de mutaciones puntuales en los codones S108N/T, N51I, C59R, I164L y C50R de *Pfdhfr* y los codones A436G, A437G, K540E, A581G y A613S/T de *Pfdhps*, considerados marcadores moleculares de resistencia *in vitro* a SP.
2. Realizar análisis de regresión logística para establecer la asociación existente entre el patrón de mutaciones hallados en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps* de *Plasmodium falciparum* y la respuesta *in vivo* al tratamiento con SP.

IV. MATERIALES Y METODOS

Se usaron muestras de sangre que fueron recolectadas en 1999, como parte de un estudio diseñado para determinar la respuesta clínica y parasitológica de pacientes tratados con una dosis estándar de SP, usando una prueba de eficacia *in vivo* basado en un formato de OPS (referencia "Assessment of Therapeutic Efficacy of Antimalarial Drugs for Uncomplicated Malaria in the Americas" (OPS/HCP/HCT/113/98)(33).

El estudio *in vivo* fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Investigación Walter Reed (WRAIR) con # MCMR-RCQ-HR (70-1n) y por el Comité de Ética de la UPCH con # CAR-017-DUIICT-99; el consentimiento informado aprobado establecía que las muestras obtenidas podrían ser usadas para futuros estudios *in vitro*. El estudio fue llevado a cabo en dos lugares representativos de Loreto, uno ubicado cerca al área urbana de Iquitos (Padre Cocha) y otro localizado en las fronteras de Perú, Brasil y Colombia (Caballococha),

1. Área de Estudio

Padre Cocha es un caserío de 1400 habitantes, localizado a orillas del río Nanay a 5 Km. Nor-Oeste de Iquitos. La porción central del caserío esta ubicada en un área de aproximadamente 1 km², se puede llegar desde la ciudad de Iquitos haciendo un viaje de unos 15 min. usando un bote. Tanto *P. v.* como *P. f.* fueron detectados por primera vez en Padre Cocha en 1994, observándose que la incidencia de ambas especies ha sufrido gradualmente un crecimiento explosivo, encontrándose un patrón estacional creciente entre 1997 y 1998. La presencia del vector *Anopheles darlingi* ha sido documentada en esta villa desde 1995. Esta villa ha sido motivo de estudios epidemiológicos y entomológicos que han brindado datos que facilitan la ejecución de estudios de eficacia *in vivo* (32, 57).

La localidad de Caballococha, es la capital del departamento de Ramón Castilla tiene una población de 3,300 habitantes, esta localizado en la región Nor Oeste de la Amazonía Peruana, ubicada a menos de 30 Km. de las

fronteras con Brasil y Colombia (33)(Figura N°3)

Figura N° 3 : Ubicación Geográfica de Padre Cocha y Caballococha



Fuente : Aramburu Guarda J, Ramal Asayag C, Witzig Malaria reemergence in the Peruvian Amazon region. *Emerg Infect Dis.* 1999 Mar-Apr;5(2):209-15. (2)

2. Características del Estudio *in vivo*:

Los criterios de inclusión fueron descritos por Magill et al (32,33), pero los describiremos brevemente: sujetos > 2 de edad con malaria no complicada causada por *P. falciparum*, con temperatura > 38.5°C y parasitemias de 250 a 100,000 parásitos asexuales/μL (83). Los voluntarios fueron diagnosticados por gota gruesa, y después se les administró SP (Fansidar®; Roche SA, Basel, Switzerland), 25mg/kg en dosis única. El seguimiento de los pacientes fue realizado en los días 2, 3, 7, 14, 21 y 28 posteriores al tratamiento.

Los pacientes fueron admitidos en el estudio, después de firmar los consentimientos informados; luego se tomaron las muestras de sangre venosa antes de la administración del tratamiento (día cero: D0). Las alícuotas de sangre total fueron almacenadas a –80°C hasta su envío al laboratorio en Lima.

3. Estudio de Polimorfismos en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps*

Las pruebas de biología molecular se llevaron a cabo en el Laboratorio de Parasitología y Central de Biología Molecular del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos – NMRCDC, Lima, Perú.

MATERIALES

1. Material Biológico: ADN genómico

- a) Alícuotas de 200 μL de sangre total colectada en anticoagulante EDTA para extraer ADN genómico de *Plasmodium falciparum* usando el kit comercial QIAGEN®, según instrucciones del fabricante.
- b) Clonas de las cepas *Plasmodium falciparum*: SL/D6 (Sierra Leona/D6, de un paciente tratado exitosamente con pirimetamina) y W2 (del aislamiento multi resistente Indo-III), proporcionadas gentilmente por el Dr. Denis Kyle, Instituto de Investigación Walter Reed (WRAIR), Washington DC, con fines de control interno.

2. Oligonucleótidos para la amplificación de los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps*.

Se usaron oligonucleótidos de sentido y antisentido para amplificar regiones de interés de una porción de 730bp de *Pfdhfr*, codones 108, 51, 59, 164 y 50, y de *Pfdhps* codones 437, 581, 613 y 540. Las secuencias fueron obtenidas a partir de literatura disponible (48, 49,75) y la síntesis fue ordenada al “Hospital for Sick Children”, Toronto, Canadá, el detalle se encuentra en los Anexos 3 y 4.

3. Reactivos

Todos los reactivos fueron de grado analítico

- Kit de extracción de DNA QIAmp® Mini kit (52).
- Dinucleótidos trifosfato (dNTPs), 125 µM Applied Biosystems®
- Oligonucleótidos iniciadores, de 50µM.
- Enzima Taq Polimerasa 1500U, 5U/µL, Invitrogen®
 - 50 mM MgCl₂
 - Buffer PCR 10X (200mM Tris-HCl, pH8.4; 500mM KCl)
- Enzimas de restricción, New England Biolabs®
 - MspA1I
 - Avall
- Agua para PCR libre de DNAasa/RNAasa
- Agarosa grado analítico (Biorad)
- Tampón TAE, Solución stock concentrada (por litro) 50X:
 - Tris base 242g
 - Ácido acético glacial 57.1mL
 - EDTA (pH 8.0) 0.5M 100mL
- Buffer de carga de muestra 6X:
 - Orange G 0.25%
 - Glicerol 30% en H₂O
- Marcadores de tamaño molecular (escalera) de 100 y 123 bp, Invitrogen®
- Soluciones de Bromuro de etidio (10 mg/mL)

4. Equipo:

- 1 Termocicladores 9600 y 9700 Perkin-Elmer, Applied Biosystems®

- 2 Congeladoras -80°C , y -20°C
- 3 Equipo de Electroforesis: fuente de Poder, cámaras electroforéticas.
- 4 Microcentrífuga
- 5 GELDOC-BIORAD®: Transiluminador y lector para geles.
- 6 Incubadoras con bloque de metal (heating block).
- 7 Mezcladores tipo Vortex.
- 8 Horno microondas.

MÉTODOS

1. PCR para la amplificación de mutaciones en el gen *Pfdhfr*.

Las reacciones de PCR se realizaron en tubos de polipropileno para PCR de 200 μL . El volumen de reacción fue de 50 μL conteniendo: 20 ng de ADN genómico, 5 μL de Buffer PCR (1X), 1.5 mM de MgCl_2 , 200 μM de dNTPs mix, 1 μM de oligonucleótidos AMP1 y AMP2, 1.5U de Taq DNA polimerasa y 28.2 μL de agua para PCR. Se busco amplificar un producto de 730 bp., bajo las siguientes condiciones: 94°C por 3 minutos de denaturación, 45 ciclos de amplificación de: 94°C por 30 segundos (denaturación), 45°C por 45 segundos (hibridación o annealing de los oligonucleótidos), 72°C por 5 minutos (extensión).

Se usaron 5 μL del producto de la primera reacción, como molde para un PCR anidado-específico de mutaciones buscando amplificaciones de los codones de interés, empleando un oligonucleótido cebador común de diagnóstico (SP1 o SP2), dependiendo del polimorfismo que se estaba buscando. Se usaron reacciones con un volumen de 50 μL en las que se utilizaron 200 μM de dNTPs, 5 μL de Buffer PCR (1X), 1.5 μM o 2.5 μM de MgCl_2 , 1 μM de cada oligonucleótido, 1.5U de Taq polimerasa y 31.2 μL de agua para PCR; los detalles de la estrategia y secuencias de oligonucleótidos se encuentran en el Anexo N° 3 y la Tabla N° 1.

2. PCR para la amplificación de mutaciones en el gen *Pfdhps*

Las mutaciones puntuales en *Pfdhps* en los codones 581, 540 y 613 fueron detectadas usando cebadores publicados previamente (Anexo N° 4). Se

usaron 5µL de ADN genómico de *P. falciparum* para preparar reacciones de PCR anidado según descrito por Plowe et al. (48, 49). En la primera vuelta, una porción de 1150 bp. del dominio DHPS fue amplificado con un PCR en un volumen de reacción de 20µL, (4µM) de dNTPs, 5µL de Buffer PCR (1X), 0.325µM los oligonucleótidos cebadores M3717 y 186; 0.6U de Taq ADN Polimerasa y 35.12 µL de agua para PCR. Las condiciones de amplificación fueron : denaturación a 95°C por 3 minutos, seguido de 45 ciclos de denaturación a 95°C por 30 segundos, hibridización a 54°C por 45 segundos y extensión de 72°C por 45 segundos, con una extensión final de 72°C por 3 minutos.

El producto de la primera vuelta fue usado para la segunda vuelta, siguiendo la estrategia del PCR anidado-específico de alelo, en reacciones de múltiplex, es decir buscando la detección del alelo silvestre y el mutante en una amplificación (Anexo N° 4).

Tabla N° 1: Esquema de los aminoácidos y codones de interés en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps*.

<i>Pfdhfr</i> codón	50		51		59		108		164	
Tipo silvestre	TGT	Cis	AAT	N	TGT	C	AGC	S	ATA	I
Variantes	<u>C</u> GT	Arg	A <u>T</u>	I	<u>C</u> GT	R	AAC A <u>C</u> C	N T	<u>I</u> TA	L
<i>Pfdhps</i> codón	436		437		540		581		613	
Tipo silvestre	TCT	S	GCT	A	AAA	K	GCG	A	GCC	A
Variantes	<u>G</u> CT	A	G <u>G</u> T	G	<u>G</u> AA	E	G <u>G</u> G	G	<u>I</u> CC A <u>C</u> C	S T

Los oligonucleótidos de diagnóstico usados tienen el extremo 3' ubicado exactamente sobre la base nucleotídica donde se ubica la mutación, y se encuentran subrayados en el esquema

Fuente: Sibley CH et al, Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? Trends. Parasitol. 2001 Dec;17 (12):582-8.

3. PCR – RFLP

Las mutaciones en los codones en posición 436 y 437 fueron estudiadas por PCR-RFLP, por medio de una reacción de PCR anidado con los cebadores 185 y 218, seguido de la digestión enzimática con dos enzimas de restricción:

- 1) *Msp A1I*, que corta exclusivamente al alelo silvestre Ala436
- 2) *Ava II*, que corta exclusivamente al alelo mutante Gli437.

Las digestiones enzimáticas fueron preparadas en reacciones de 40µL según instrucciones del fabricante (New England Biolabs, Inc.). (Tabla N° 2)

Tabla N° 2 : Esquema de PCR-RFLP usado para estudiar los codones 436 y 437 del gen *Pfdhps*

Enzima	Sitio de Restricción	Buffer	Temperatura	Tiempo
<i>MspA1I</i>	5'... CMG [▼] CKG ... 3' 5'... GKC [▲] GMC...3'	NEB Buffer 4	37°C	60 min.
<i>AvaII</i>	5'... G [▼] GWCC ... 3' 5...CCWG [▲] G...3'	NEB Buffer 4	37°C	60 min.

Fuente: Información técnica de New England Biolabs

4. Visualización, Registro y Análisis de Productos de Amplificación

Los productos de amplificación de todas las reacciones fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1 o 2%, coloreados en soluciones de bromuro de etidio (0.5µg/mL), y observados bajo luz UV (Anexo N° 5).

La presencia de una banda se interpreto como amplificación del codón de interés, sea este silvestre o mutante. En el reporte final se indica el aminoácido hallado en cada codón.

5. Análisis de Resultados de la Prueba de Eficacia *in vivo*

Los datos *in vivo* fueron clasificados usando como referencia al último documento técnico de OMS (World Health Organization, 2003. Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria) (86).

Finalmente, los datos fueron agrupados en 2 variables: S=sensible y R=resistente

- 1) Respuesta Clínica (Anexo N° 7)
 - a) RCPA = S
 - b) FCT, FPT y FTP = R
- 2) Respuesta Parasitológica (Anexo N° 6)
 - a) S = sensible.
 - b) RI, RII y RIII = R

6. Análisis de Codones y determinación de Genotipos

Los polimorfismos en *Pfdhfr*, fueron agrupados en dos genotipos (Tabla N° 3):

1. DHFR mutante simple (1M): 108Asn
2. DHFR triple mutante (3M): 108Asn/ 51Ile/ 164Leu

Tabla 3. Esquema de Análisis de Mutaciones en Codones de Interés del gen *Pfdhfr*

Codón DHFR					Genotipo
S108N	N51I	C59R	I164L	C50R	
108N	N51	C59R	I164	C50R	Mutación simple
108N	51I	C59R	164L	C50R	Triple Mutante

Los polimorfismos en *Pfdhps*, fueron agrupados en 3 genotipos (Tabla N° 4):

1. DHPS silvestre : ausencia de mutaciones
2. DHPS doble mutante (2M) : 437Gli/A581Gli
3. DHPS triple mutante (3M) : 437Gli/A581Gli y 540Glu

Tabla N^o 4. Esquema de Análisis de Mutaciones en Codones de Interés del gen *Pfdhps*

Codón DHPS					Genotipo
A581G	A436G	A437G	K540E	A613S/T	
A581	A436	A437	K540	A613	Silvestre
581G	A436	437G	K540	A613	Doble mutante
581G	A436	437G	540E	A613	Triple mutante

Las interacciones entre las mutaciones en ambos genes fueron agrupadas sumándolas y se obtuvo así DHFR/DHPS quintuple mutante (5M) y séxtuple mutante (6M) (Tabla N^o 5):

Tabla N^o 5 : Sistema de Clasificación para Genotipos de *Pfdhfr* y *Pfdhps* en *Plasmodium falciparum*

Genotipo DHFR	Genotipo DHPS	Genotipo DHFR/DHPS
Simple (1M)	Tipo silvestre	Simple
Triple mutante(3M)	Doble mutante(2M)	Quíntuple mutante(5M)
Triple mutante (3M)	Triple mutante(3M)	Séxtuple mutante(6M)

7. Análisis Estadístico: Asociación entre Mutaciones en *Pfdhfr*/*Pfdhps* y Respuesta Clínica/Parasitológica al Tratamiento con SP.

Para realizar el análisis de regresión logística, encontrar los valores de OR (odds ratio o razón de disparidad) y determinar la existencia de asociación entre la respuesta clínica *in vivo* y los datos de PCR o *in vitro* se usó el programa STATA 8. (State Corp., College Station, TX), los intervalos de confianza fueron establecidos al 95%. Las tablas de frecuencias fueron elaboradas usando el programa SPSS.

V. RESULTADOS

1. Resultados del Estudio de eficacia *in vivo* a SP

Se estudiaron un total 86 muestras de voluntarios que fueron elegibles para el análisis de marcadores moleculares por PCR después de analizar un total 105 fichas clínicas de pacientes que fueron admitidos en los ensayos clínicos de evaluación de eficacia *in vivo* a SP, realizados en 1999 (32,33), aplicando criterios recomendados por OMS (86).

Se estudiaron 52 pacientes procedentes de Padre Cocha (60,5%) y 34 de Caballococha (39,5%), la edad promedio de los voluntarios fue de 22 años, el 57% (n=49) fueron caballeros y el 43% (n=37) fueron damas, la media geométrica de la densidad parasitaria fue 7130.051 parásitos/ μ L según se muestra en la Tabla N° 6.

Tabla N° 6: Reporte de Datos Demográficos por lugar de estudio

VARIABLE	Padre Cocha (n =52) 60,5%	Caballococha (n = 34) 39,5%	TOTAL (n=86) 100%
Edad promedio (años)	20.52	24.26	22
Masculino	22	27	49
Femenino	30	7	37
Parásitos/ μ L (Día 0) Media geométrica	9331.42	4724.68	7130.051

Un total de 19 pacientes fueron excluidos del análisis por PCR: 13 pacientes procedentes de Padre Cocha, 10 por presentar infección mixta con *P. vivax* y 3 por presentar parasitemias superiores a 200,000 parásitos / μ L. No se observaron abandonos del seguimiento del tratamiento. Así mismo, se excluyeron 6 pacientes procedentes de Caballococha: 3 por presentar parasitemias menores de 250 parásitos/ μ L, y 3 por no haber completado los 14 días de seguimiento (33).

Se determinó que el 40,7% de los pacientes fueron sensibles al tratamiento con SP, mientras que el 59,3% presentó diferentes grados de resistencia parasitológica, siendo el tipo RIII, la que tenía el mayor porcentaje (25,6%).

Con respecto los resultados por localidades: en Padre Cocha, se encontró que el 42,3% de los pacientes fueron sensibles a SP, mientras que el 57,7% restante presentó diferentes grados de resistencia parasitológica, siendo el tipo RIII, la que tenía el mayor porcentaje (26,9%). En relación a Caballococha, se encontró que el 38,2% de los pacientes fueron sensibles a SP, mientras que el 61,8% restante presentó diferentes grados de resistencia parasitológica (Tabla N° 7), siendo el tipo RIII, la que tenía el mayor porcentaje (23,5%).

Al realizar la clasificación clínica (Tabla N° 8), se encontró que el 41,9% de los pacientes presentaron RCPA, y el 58% restante presentó diversos grados de resistencia al tratamiento con SP: 23,3% con FTP, 33,7% con FPT y 1,2% FCT.

Con respecto los resultados por localidades: en Padre Cocha, se encontró que el 41,3% de los pacientes presentaron una RCPA, mientras que el 26,9% presentaron FTP, el 28,8% FPT y un paciente que representa el 1,9% presentó FCT. En relación a Caballococha, se encontró que el 41,2% de los pacientes presentaron RCPA, mientras que el 17,6% presentó FTP, 41,2% FPT, no se encontró FCT en esta localidad.

Finalmente, con el fin de realizar el análisis de regresión logística, todos los datos fueron agrupados en dos variables, sensible(S) y resistente (R) (Tabla N° 9).

Tabla Nº 7: Resultado Parasitológico del Estudio de Eficacia *in vivo* a Sulfadoxina-Pirimetamina, Región Loreto, 1999.

Resultado Parasitológico	RI o reinfección	RII	RIII	Sensible	TOTAL
Caballococha	2	11	8	13	34
	5,9%	32,4%	23,5%	38,2%	
PadreCocha	9	7	14	22	52
	17,3%	13,5%	26,9%	42,3%	
TOTAL	11	18	22	35	86
	12,8%	20,9%	25,6%	40,7%	100%

Tabla Nº 8: Resultado Clínico del Estudio de Eficacia *in vivo* a SP, Región Loreto, 1999

Resultado clínico	FCT	FPT	FTP	RCPA	Total
Caballococha	0	14	6	14	34
	0%	41,2%	17,6%	41,2%	
Padre Cocha	1	15	14	22	52
	1,9%	28,8%	26,9%	42,3%	
TOTAL	1	29	20	36	86
	1,2%	33,7%	23,3%	41,9%	100%

Tabla Nº 9: Consenso de Resultados de Estudio de Eficacia *in vivo* a SP, Región Loreto, 1999.

Localidad	Criterio de Clasificación			
	Clínico		Parasitológico	
	R	S	R	S
Caballococha	20	14	21	13
	(23,3%)	(16,3%)	(24,4%)	(15,1%)
Padre Cocha	30	22	30	22
	(34,9%)	(25,6%)	(34,9%)	(25,6%)
TOTAL	50	36	51	35
	58,1%	41,9%	59,3%	40,7%

2. Polimorfismos en *Pfdhfr*

Tomando como base la clasificación clínica se determinó que en el caso de *Pfdhfr*, el 100% de los aislamientos presentaron el alelo mutante S108N, y alelos silvestres en los codones C50R y C59R.

Se encontraron alelos mutantes en los codones N51I e I164L (Figura N°4) en 19 de los 20 pacientes con FTP en 21 de los 29 pacientes con FPT y en 1 con FCT así como en 7 de los 36 pacientes con RCPA (Tabla N° 10).

3. Polimorfismos en *Pfdhps*

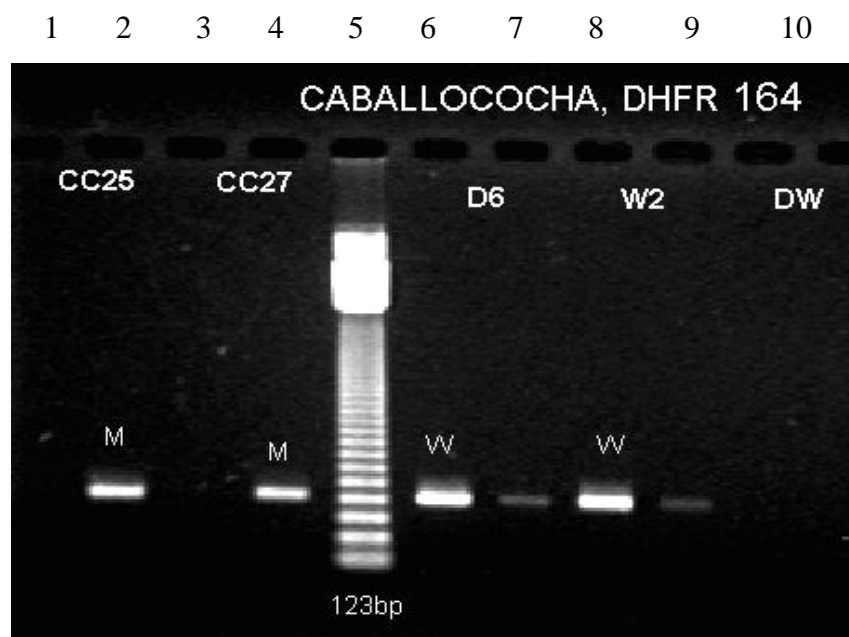
Respecto a polimorfismos en *Pfdhps*, el 100% de las muestras presentaron los alelos silvestres en los codones: S436A y A613T/S.

Se encontraron alelos mutantes en los codones A581G (Figura N°5) y A437G en el 55,80 % de los pacientes: 19 de los 20 pacientes que tenían FTP, 21 de los 29 con FPT, el único que tenía FCT y 7 de los 36 con RCPA. Además, de los 36 aislamientos, 30 (34,9%) presentaron el alelo mutante K540E en 17 de los 20 pacientes tenían FTP, 11 de los 29 que tenían FPT y uno que presento FCT. Los resultados pueden ser visualizados en la Tabla 10.

Tabla 10: Polimorfismos en *Pfdhfr* y *Pfdhps* vs. Respuesta Clínica al Tratamiento con SP

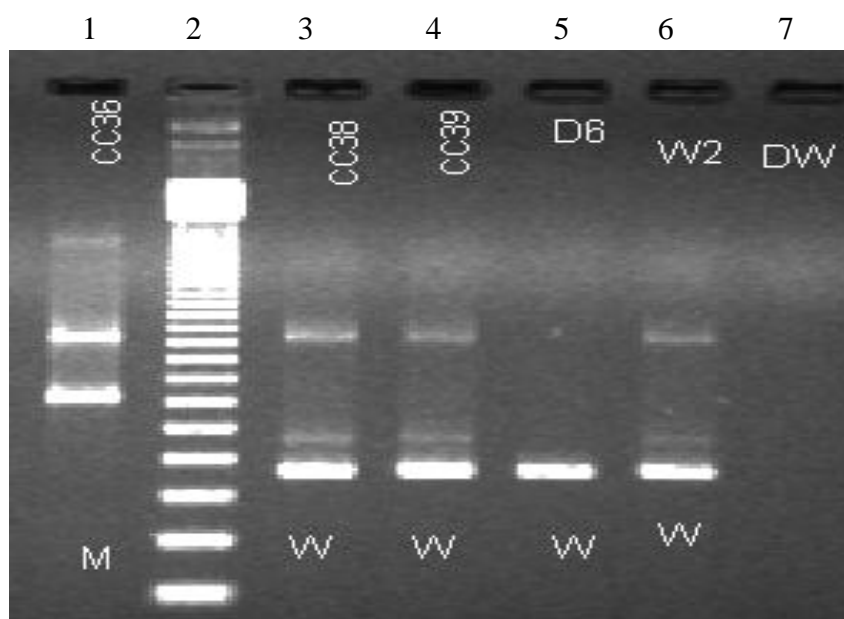
Polimorfismos en DHFR/DHPS	Clasificación Clínica				TOTAL
	FCT	FPT	FTP	RCPA	
SILVESTRES					
dhfr : I164, I51 dhps : A581, A437	0 0%	8 27,60%	1 5%	29 80,60%	38 44,20%
dhps K540	0 0%	18 62,10%	3 15%	35 97,20%	30 34,90%
MUTANTES					
dhfr : 164L, 51N dhps : 581G, 437G	1 100%	21 72,40%	19 95%	7 19,40%	48 55,80%
dhps 540E	1 100%	11 37,90%	17 85%	1 2,80%	56 65,10%

Figura N° 4: Resultados de Electroforesis en Geles de Agarosa de productos de PCR, correspondientes al codón 164 del gen *Pfdhfr*.



Los carriles 1, 4 presentan amplificaciones para el alelo mutante *Leu164*. Carriles 1, 3 presentan resultados negativos para el alelo silvestre *Ile614*. Carriles 6 y 8 presentan con amplificaciones del alelo silvestre *Ile64*. Carril 5 marcador ladder de 123 bp.

Figura N° 5 : Resultados de Electroforesis en Geles de Agarosa de productos de PCR, correspondientes al codón 581, del gen *Pfdhps*.



El carril 1 presenta amplificación del alelo mutante *A581G*, carril 2: ladder de 123 bp.; carriles 3 y 4 presentan resultados de amplificaciones del alelo mutante *A581G*; carriles 5 y 6: amplificaciones de cepas de control (D6 y W2). Carril 7: control negativo: agua destilada.

4. Genotipos en *Pfdhfr* y *Pfdhps*

Respecto a los genotipos encontrados en *Pfdhfr*:

- a) 44,2% (n=38) de las muestras presentaron el genotipo 1M=108Asn.
- b) 55,8% (n=48) presentaron el genotipo 3M=108Asn/51Ile/164Leu.

En relación a *Pfdhps*:

- a) 44,2% de las muestras presentaron el genotipo silvestre.
- b) 20,9% presentaron el genotipo 2M=581Gli/437Gli, y
- c) 34,9% presentaron el genotipo 3M= 581Gli/437Gli/540Glu.

Así mismo se encontraron genotipos de fármaco resistencia en una combinación de 6 mutaciones: *Pfdhfr* 108Asn/51Ile/164Leu y *Pdhfps* 581Gli/437Gli/540Glu.

Otra observación fue un quintuple mutante: *Pfdhfr* 108Asn/51Ile/164Leu y *Pdhfps* 581Gli/437Gli.

Para el análisis de los genotipos se usaron las frecuencias de polimorfismos basados en respuesta parasitológica, encontrándose:

- a) En relación a 30 de los 51 pacientes que fueron resistentes a SP y que presentaron el genotipo DHFR/DHPS 6M:17 de los cuales presentaron resistencia RIII, mientras que 7 presentaron resistencia tipo RII y 6 presentaron resistencia RI (Tabla N° 11).
- b) Con respecto a los 18 aislamientos que presentaron el genotipo DHFR/DHPS 5M: 12 presentaron resistencias RIII (n=4), RII (n=6), y RI (n=2), y 6 fueron sensibles a SP. (Tabla N° 12).
- c) Respecto a los últimos 38 pacientes: 9 fueron resistentes a SP y solo presentaron el alelo mutante 108N, un paciente tuvo una falla tipo RIII y 5 presentaron falla tipo RII. Finalmente, los 29 pacientes que completaron los 28 días de tratamiento presentaron el alelo mutante S108N (Tabla N° 13).

Tabla N° 11:

Polimorfismos en el genotipo DHFR/DHPS 6M, correspondiente al Tratamiento con SP (n=30)

[illegible]

Tabla N° 12:

Polimorfismos en el genotipo DHFR/DHPS 5M, correspondiente al Tratamiento con SP (n=18)

DHFR					DHPS					Clasificación Parasitológica
S108T/N	C50R	N51I	C59R	I164L	A581G	S436A	A437G	K540E	A613T/S	
N	C	I	C	L	G	S	G	K	A	RIII
N	C	I	C	L	G	S	G	K	A	RIII
N	C	I	C	L	G	S	G	K	A	RIII
N	C	I	C	L	G	S	G	K	A	RIII
N	C	I	C	L	G	S	G	K	A	RII
N	C	I	C	L	G	S	G	K	A	RII
N	C	I	C	L	G	S	G	K	A	RII
N	C	I	C	L	G	S	G	K	A	RII
N	C	I	C	L	G	S	G	K	A	RII
N	C	I	C	L	G	S	G	K	A	RII
N	C	I	C	L	G	S	G	K	A	RI tardía
N	C	I	C	L	G	S	G	K	A	RI temprana
N	C	I	C	L	G	S	G	K	A	S
N	C	I	C	L	G	S	G	K	A	S
N	C	I	C	L	G	S	G	K	A	S
N	C	I	C	L	G	S	G	K	A	S
N	C	I	C	L	G	S	G	K	A	S
N	C	I	C	L	G	S	G	K	A	S

Polimorfismos en el genotipo DHFR 1M, correspondiente al Tratamiento con SP
(n=38)

33

5. Impacto de la edad en el Resultado Clínico

El 29% (n=25) de la población fueron niños; 8 (de 5 años o menos), de los cuales 2 fueron sensibles a SP y presentaron el genotipo 1M y los 6 restantes con genotipos 5M y 6M. De otro lado, de un total de 17 niños (de 5 a 13 años), 10 fueron sensibles a SP con un genotipo 1M, y los 7 restantes presentaron resistencias tipo RI,RIII y RII, con genotipos 5M y 6M.

6. Análisis de Regresión Logística

Los resultados del análisis de regresión logística se reportan en términos de valores de OR (Tabla N° 14), encontrados según el genotipo presente en el parásito causante de la infección inicial y que basándonos en la clasificación clínica dieron los siguientes resultados que fueron significativos.

- 1) DHFR 3M = OR 18,87 (IC :6.31-56.49), p-value <0.001)
- 2) DHPS 2M y DHFR/DHPS 5M = OR 6.44 (IC: 1.88-22.11, p-value 0.003).
- 3) DHPS 3M y DHFR/DHPS 6M= OR 93,44 (IC: 11.11-785.57), p-value <0.001), que representa un valor de 5 veces el valor de genotipo 1M y 15 veces al del genotipo 5M.

En general se observa que según aumenta el número de mutaciones se incrementa el riesgo de fallar al tratamiento con SP.

Así mismo, tomando como referencia los datos clasificados según criterio parasitológico (Tabla N° 15) se encontraron los siguientes valores de OR:

- 1) DHFR 3M= OR 22,56 (IC: 7,24-70,26), p-value <0.001), que representa un valor 3 veces al del 5M.
- 2) DHPS 2M y DHFR/DHPS 5M = OR 6,44 (IC :1.88-22.11, p-value 0.003).
- 3) DHPS 3M y DHFR/DHPS 6M: no se puede determinar al no haber pacientes con genotipo 6M y a la vez sensibles al tratamiento con SP.

Con la finalidad de visualizar los resultados se prepararon gráficos de barras (Figuras N° 6 y 7), que nos permiten ver que los tratamientos fueron exitosos cuando habían < 3M DHFR, <2M DHPS y en general < 5M en la combinación DHFR/DHPS, una vez que estos límites fueron sobrepasados, la mayoría de pacientes experimentaron falla de tratamiento con SP.

Tabla Nº 14: Riesgo de desarrollar malaria causada por *P. falciparum* sensible
o resistente al tratamiento con SP, por mutaciones en *Pfdhfr* y *Pfdhps*

CLASIFICACION CLINICA – AMBAS LOCALIDADES

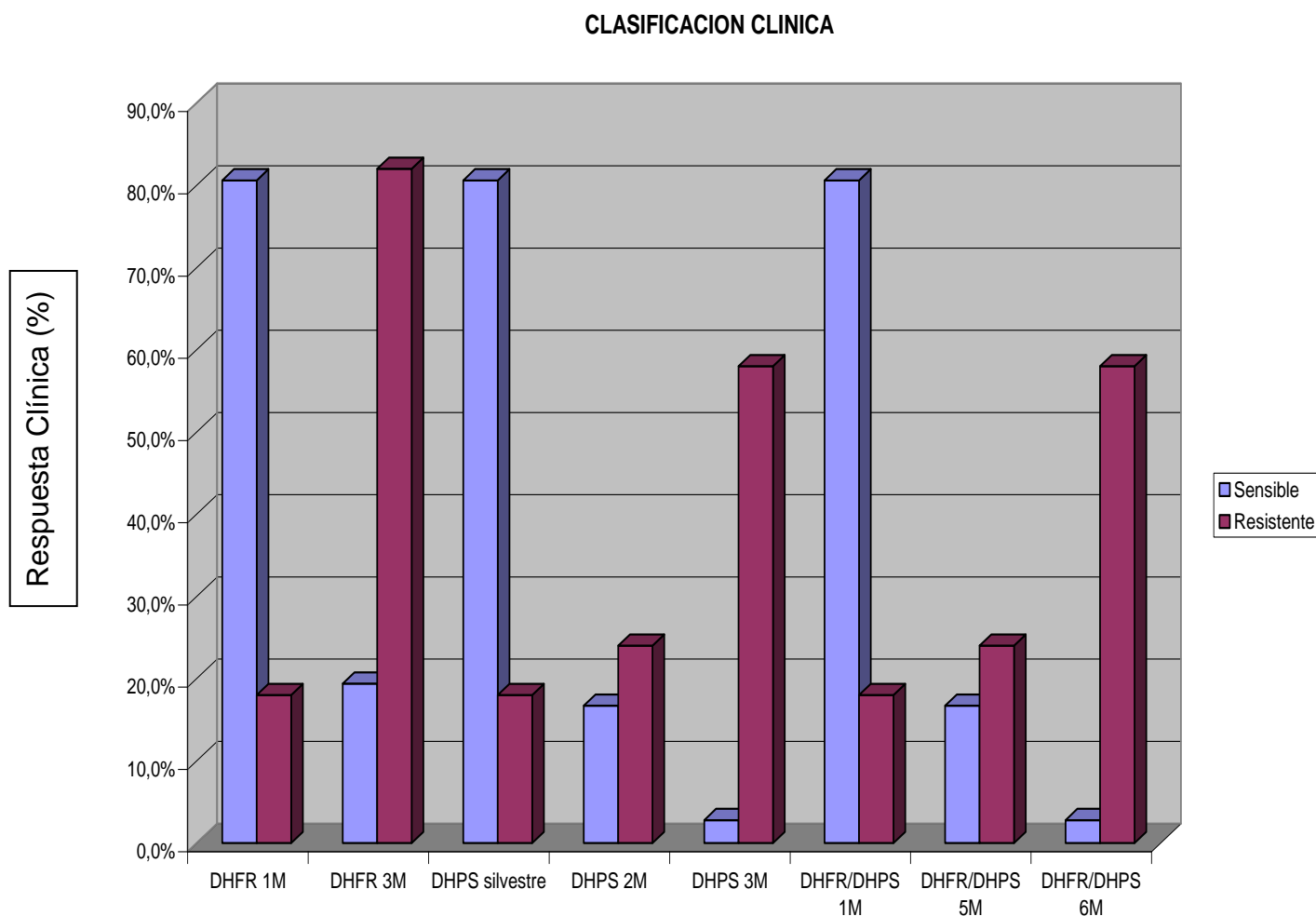
Mutaciones	Resultado del Tratamiento con SP				Análisis de Regresión Logística		
	Sensible		Resistente		OR	(95% IC)	p-value
	Nº	%	Nº	%			
DHFR							
Simple	29	80,6	9	18,0	Ref.		
Triple	7	19,4	41	82,0	18,87	(6.31-56.49)	<0.001
DHPS							
Silvestre	29	80,6	9	18,0	Ref.		
Doble	6	16,7	12	24,0	6,44	(1.88-22.11)	0.003
Triple	1	2,8	29	58,0	93,44	(11.11-785.57)	<0.001
DHFR/DHPS							
Simple	29	80,6	9	18,0	Ref.		
Quíntuple	6	16,7	12	24,0	6,44	(1.88-22.11)	0.003
Séxtuple	1	2,8	29	58,0	93,44	(11.11-785.57)	<0.001

Tabla Nº 15: Riesgo de desarrollar malaria causada por *P. falciparum* sensible
o resistente al tratamiento con SP, por mutaciones en *Pfdhfr* y *Pfdhps*

CLASIFICACION PARASITOLOGICA – AMBAS LOCALIDADES

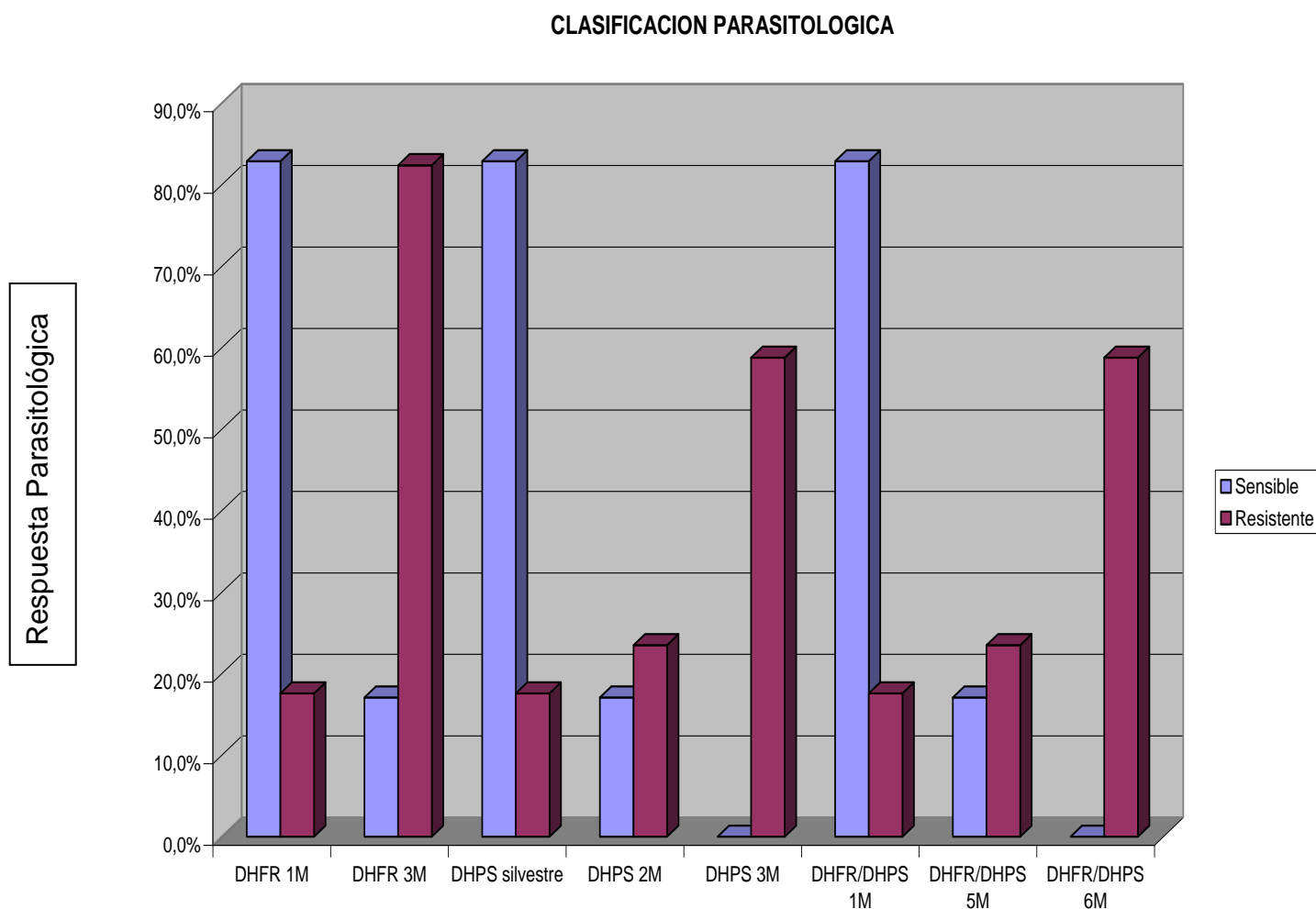
Mutaciones	Resultado del Tratamiento con SP				Análisis de Regresión Logística		
	Sensible		Resistente		OR	(95% CI)	p-value
	Nº	%	Nº	%			
DHFR							
Simple	29	82,9	9	17,6	Ref.		
Triple	6	17,1	42	82,4	22,56	(7.24-70.26)	<0.001
DHPS							
Silvestre	29	82,9	9	17,6	Ref.		
Doble	6	17,1	12	23,5	6,44	(1.88-22.11)	0.003
Triple	0	0	30	58,8	NA	NA	NA
DHFR/DHPS							
Simple	29	82,9	9	17,6	Ref.		
Quíntuple	6	17,1	12	23,5	6,44	(1.88-22.11)	0.003
Séxtuple	0	0	30	58,8	NA	NA	NA

Figura N° 6: Genotipos de Dihidrofolato Reductasa (DHFR) y Dihidropteroato sintasa (DHPS) de *Plasmodium falciparum* vs Resultados de Clasificación Clínica del Tratamiento con SP, Región Loreto, 1999



Leyenda: Las barras azules representan a los pacientes sensibles al tratamiento con SP, las moradas a los que fueron resistentes. 1M=presencia de un alelo mutante; 2M=dos alelos mutantes; 3M= tres alelos mutantes, 5M=cinco alelos mutantes, 6M=seis alelos mutantes.

Figura N° 7: Genotipos de Dihidrofolato Reductasa (DHFR) y Dihidropteroato sintasa (DHPS) de *Plasmodium falciparum* vs. Resultados de Clasificación Parasitológica del Tratamiento con SP, Región Loreto, 1999



Leyenda: Las barras azules representan a los pacientes sensibles al tratamiento con SP, las moradas a los que fueron resistentes. 1M=presencia de un alelo mutante; 2M=dos alelos mutantes; 3M= tres alelos mutantes, 5M=cinco alelos mutantes, 6M=seis alelos mutantes.

VI. DISCUSION

En este estudio se realizó un análisis retrospectivo de 86 muestras de sangre que fueron recolectadas de dos áreas geográficas distintas de la región Loreto en 1999 como parte de un estudio de investigación efectuado para evaluar la eficacia *in vivo* a SP (32,33). Se usó el PCR anidado y un PCR-RFLP, para buscar polimorfismos en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhps* para determinar la frecuencia de mutaciones. De igual forma se realizaron clasificaciones de las respuestas *in vivo* para luego proceder a aplicar la regresión logística con el fin de encontrar la asociación existente entre estos dos métodos para evaluar la eficacia de SP.

Durante el periodo 1990-1999, el Perú sufrió un fenómeno de reemergencia de malaria causada por *P. falciparum* y *P. vivax* tanto en la cuenca Amazónica como en la costa Norte del país. Este fenómeno estuvo asociado con la aparición y extensión de fármaco resistencia a medicamentos antimaláricos (2).

Los estudios de eficacia *in vivo* de medicamentos antimaláricos llevados a cabo entre los años 1998 y 2000 demostraron que en el Perú habían dos patrones geográficos de fármaco resistencia del *P. falciparum*. En la costa Norte, las cepas tenían alta resistencia a CQ pero eran sensibles a SP. En la Amazonia los estudios mostraron alta resistencia tanto a CQ como a SP (33, 34,35). Identificado el problema fue necesario implementar un cambio en los medicamentos de primera línea para el tratamiento de malaria causada por *P. falciparum* en ambas regiones (36,39, 61).

De otro lado, en la última década la OMS viene dando énfasis al establecimiento y aplicación de protocolos estándar de evaluación de eficacia *in vivo* a medicamentos antimaláricos (58-61), y promueve la estandarización de los métodos *in vitro* con el fin de conducir una monitorización efectiva del surgimiento y evolución de la fármaco resistencia de *P. falciparum* (87). Es interesante notar que la OMS también recomienda aprovechar las herramientas de biología molecular y usar por ejemplo la información brindada por el

secuenciamiento del genoma de *P. f.*(84), para estudiar marcadores moleculares asociados a resistencia de medicamentos antimaláricos, así en un documento técnico de OMS emitido en Diciembre del 2001 se recomienda no sólo usarlos sino complementar los hallazgos con pruebas de genotipificación para ver dispersión de clonas resistentes a antimaláricos(5, 56).

Los métodos que se usan en la actualidad para la genotipificación de mutaciones conocidas y que desde luego se aplican para el estudio de los genes *Pfdhfr* y *Pfhdps*, se basan en el secuenciamiento del DNA como prueba de referencia, o en la detección de mutaciones por PCR-RFLP (15) o por PCR específico de mutaciones (48, 49), reservando a las técnicas de expresión en levaduras para la búsqueda de nuevas mutaciones asociadas por ejemplo a fármaco resistencia a SP (9, 38, 41).

Por lo tanto considerando las alternativas existentes y evaluando el presupuesto disponible, para el presente estudio se optó por el PCR anidado-alelo específico y un PCR-RFLP por ser métodos rápidos, confiables y reproducibles, permitiendo su uso a gran escala en investigación de tipo epidemiológica. Así, se estudiaron los 5 codones de interés en *Pfdhfr* y 3 de los 5 codones de interés en *Pfhdps*, y PCR anidado-RFLP para los codones 436 y 437, usando cebadores y enzimas de restricción publicados previamente (49, 75) los que habían sido diseñados para detectar cambios en las bases nucleotídicas presentes en cada uno de los codones de interés de *Pfdhfr* y de *Pfdps*. Estos cebadores de diagnóstico difieren en la última base del extremo 3' y son usados bajo condiciones que permiten amplificación sólo cuando existe una coincidencia perfecta. Así mismo, se emplea un cebador de complementario a una parte conservada de los dominios en estudio que se emparejan con cada cebador de diagnóstico para lograr amplificaciones usando ADN de muestras colectadas en el campo (20, 48).

Otra variable considerada para este estudio fue la clasificación de los datos clínicos recolectados en 1999 cuando se realizó el estudio de eficacia *in vivo* a SP, para este fin se tomó como referencia el último documento técnico de la OMS para evaluación y monitorización de la eficacia del tratamiento de

malaria no complicada (86). Por lo general la tarea de clasificar a los pacientes es asignada a un médico entrenado para este propósito, por esa razón se contó con la colaboración del Dr. Trenton Ruebush del CDC, quien supervisó sobre todo la clasificación de los datos de Padre Cocha.

Se pudo comprobar que en general, los dos criterios de clasificación, sea clínico o parasitológico correlacionan muy bien, pero en el particular caso de este estudio ambas clasificaciones varían a causa de un paciente procedente de Caballococha, que según la clasificación parasitológica es sensible al tratamiento con SP y que al aplicar la clasificación clínica resulta “resistente al tratamiento”, por esa razón decidimos usar todos los datos clínicos para realizar los análisis de regresión logística, por localidades y por tipo de clasificación y de otro lado la clasificación parasitológica, que es válida para áreas con baja transmisión de malaria como la Amazonia Peruana (58,61,82), pero sobre todo para poder establecer comparaciones con otros estudios que encontramos en la literatura.

Continuando con los criterios considerados para el análisis de datos, un concepto que es conveniente introducir ahora es el de “**presión de selección**”: La resistencia a los antimaláricos emerge y se dispersa debido a una ventaja selectiva que tienen los parásitos resistentes para “sobrevivir” en presencia del antimalárico al cual son resistentes. La presión de selección describe la intensidad y magnitud del proceso de selección, ya que cuanto más grande es la proporción de parásitos resistentes expuestos a concentraciones de un antimalárico que permite la proliferación de los parásitos resistente más no de los sensibles, entonces más grande será la presión de selección. Este concepto es importante para comprender la situación de fármaco resistencia a SP, ya que el uso continuo y prolongado de este fármaco ha llevado a la selección del genotipo cuádruple mutante en *Pf dhfr* los alelos altamente resistentes en *Pf dhps*, así que se observa en América del Sur y en Sud Este de Asia (65).

En África, donde la transmisión es usualmente intensa, la proporción de parásitos bajo presión de droga es mucho más baja que en áreas donde hay

baja transmisión como en América del Sur o el Sud Este Asiático, donde la resistencia a SP surgió rápidamente. Esto se debe a que la transmisión es alta, y por lo tanto la semi-inmunidad es común y en consecuencia la mayoría de infecciones pasan asintomáticas y en consecuencia curan sin recibir tratamiento. En cambio, en un lugar donde la transmisión y la inmunidad son bajas, como en el caso de la región Loreto, la mayoría de infecciones son asintomáticas y se encuentran por lo tanto bajo la presión de uso de la droga, así lo demuestra el caso de Malawi, donde a pesar del uso de SP desde 1993-2003 este todavía es eficaz en ese país (51).

Basándonos en los conceptos antes mencionados, concluimos que las muestras en estudio eran monoclonales, un concepto útil para poder clasificar a los genotipos hallados en *Pfdhfr* y *Pfdhps*; por esa razón, una infección que involucraba al alelo mutante S108N en *Pfdhfr*, fue considerada: mutante simple (1M), y una infección que además involucraba a los alelos mutantes en los codones N51I e I164L fue considerada “triple mutante” (3M). Ya que las mutaciones en los codones 51 y 164 solo fueron halladas en presencia de mutación en el codón 108, la presencia de Ile51 indica que el parásito posee por lo menos 2 mutaciones. A diferencia de las evidencias presentadas en estudios realizados en África, sería posible estudiar dos mutaciones en la región Loreto y ser capaces de predecir la presencia de una tercera.

Retomando el caso de la región Loreto, al comparar las frecuencias de los genotipos DHFR/DHPS 5M (24%) y 6M (58%) (Tabla N° 14), en los casos resistentes al tratamiento con SP, estos porcentajes se explicarían por el intenso uso de SP en la región Amazónica del Perú, especialmente en áreas de la región Loreto al haber sido usada como terapia alternativa frente a la emergente resistencia a CQ, tanto en los alrededores de la ciudad de Iquitos y hacia el Este cerca de las fronteras con Brasil y Colombia. Además en la década de 1980 la malaria severa se trataba con Quinina endovenosa y SP. Se detuvo el uso de SP en Agosto de 1999 (39) en consecuencia a más tiempo de uso de SP se observó mayor número de mutaciones (76, 77).

En relación a nuestra cohorte en estudio, de los 30 pacientes fueron

resistentes a SP y que presentaron el genotipo 6M, el 56,7% (n= 17) presentaron resistencia RIII, el 23,3% (n=7) presentaron resistencia tipo RII y el 20%(n=6) presentaron resistencia RI (Tabla N°11), en este caso la proporción de las resistencias encontradas puede ser representada como RIII>RII>RI, lo que nos permite inferir que este genotipo 6M involucra en su mayoría a los pacientes con la resistencia *in vivo* más severa (RIII) ya que se presenta después de sólo 2 días de administrado el tratamiento.

Con respecto a los 18 aislamientos que presentaron el genotipo DHFR/DHPS 5M, el 33,33% (n= 6) fueron sensibles a SP y el 66,66% (n=12) fallaron con resistencias que por el numero de pacientes pueden ser presentadas con la relación. RII>RIII>RI (Tabla N°12), es decir según van reduciendo el numero de mutaciones se reduce el grado de severidad de la resistencia, en este caso le mayor número de pacientes tenía un RII, es decir con parasitemias en el día 2 y 7 después de administrado el tratamiento.

Respecto a los últimos 38 pacientes (Tabla N° 13): el grado de sensibilidad a SP puede ser representado como S>RII>RI>RIII, considerando que solo el 23,7% (n=9) fueron resistentes a SP y que presentaron el alelo mutante 108N, (incluyendo en este grupo a los pacientes con RI, RII Y RIII) con lo que confirmamos que la presencia de esta mutación es suficiente para conferir R *in vitro* a SP. Finalmente, los 29 pacientes que completaron los 28 días de tratamiento y que fueron sensibles a SP a pesar de presentar el alelo mutante S108N.

Es conveniente mencionar que como parte de otro trabajo de investigación realizado en el 2006, todos los resultados de PCR de *Pfdhfr* fueron confirmados por secuenciamento y así se pudo determinar 1) la presencia del alelo silvestre A16V y 2) la presencia de la inserción de 15bp llamada “repetición Bolivia” (BR) (62) y se determinó que se encuentra en un 100% de asociación con el genotipo 3M (108N/51I/164L). Cabe resaltar que esta inserción sólo se encuentra en muestras de América del Sur (49,74), y aunque inicialmente no se le encontró en asociación con resistencia *in vitro* a SP, se piensa que tiene un rol compensatorio ante la presencia de las otras 3

mutaciones (9); la adición de el BR no cambia los resultados de las frecuencias de los polimorfismos encontrados.

Por lo tanto, si comparamos nuestros datos con los obtenidos por Kublin et al, en 1997, la caracterización molecular de solo dos años de diferencia ha variado ya que entonces se habían hallado genotipos de fármaco resistencia en un área considerada como altamente resistente a SP: 1) un séxtuple mutante *Pfdhfr* codones S108N, N51I y I164L además de la inserción “Bolivia repeat”(BR), así como *Pdhfps* codones A437G, K540E y A581G que tenía alta prevalencia 2) la mutación simple Asn108, hallada incluso en pacientes sensibles a SP, 3) un doble mutante en DHFR compuesto por Asn108 y Leu164 en un paciente con resistencia clínica RII (26).

Este patrón de mutaciones es diferente al hallado en áreas al Oeste de la Amazonia alrededor de Pampa Hermosa/Alianza y Ullpayacu donde el uso de SP fue mínimo, y en consecuencia la presión de uso de la droga fue más bajo, puesto que CQ siguió siendo terapia de primera línea para infecciones por *P.f.* hasta finales del 2002 (14).

Existen varias explicaciones para el patrón de resistencia en el Oeste de la región amazónica del Perú: sulfadoxina-pirimetamina ha sido ampliamente usada como terapia alternativa a CQ desde finales de los 1990s en las áreas alrededor de la ciudad de Iquitos y en el área Este hacia las fronteras con Colombia y Brasil. En contraste, en las áreas alrededor de Pampa Hermosa/Alianza y Ullpayacu, el uso de SP había sido mínimo y en consecuencia la presión de la droga había sido mucho más baja, puesto que CQ había sido la terapia de primera línea para el tratamiento de malaria causada por *P. falciparum* hasta finales del 2002 (14).

De otro lado, si comparamos los patrones de polimorfismos hallados en Caballococha y Padre Cocha en 1999, con los hallados en otras regiones de América del Sur, encontramos que la presencia de los 3 polimorfismos mutantes tanto en *Pfdhfr* (Asn108/Ile51/Leu164)) como en *Pdhfps* (Gli581/Gli437/Glu540) son similares a los encontrados en Brasil (74), y en

general similares a los prevalentes en el Sud Este Asiático donde hay alta resistencia a SP; el patrón en ambos de los alelos silvestres encontrados en los codones *Pfdhfr* 50 y 59 y *Pfdhps* 613 y 437 es similar en ambas regiones.

Consideremos luego a Bolivia (49) y Suriname (43) que comparten el mismo patrón de mutaciones en *Pfdhfr* (Asn108/Arg50/Ile51) aunque difieren en *Pfdhps*, Gli437 en Suriname y Gli581 en Bolivia. Colombia (63) presenta un patrón diferente *Pfdhfr* (As108/Ile51/Arg59) y el alelo mutante Gli437 en *Pfdhps*, lo que nos hace concluir que al existir presión de uso de SP o análogos en estas áreas, la emergencia de alta resistencia a antifolatos es inminente.

Las relaciones existentes entre las mutaciones en *Pfdhfr* y *Pfdhps* con la resistencia a antifolatos es menos complicada en áreas geográficas donde se sabe que la complejidad genética de *P. falciparum* es relativamente baja, como ocurre en el Perú; donde grupos estables de mutaciones en *Pfdhfr* y *Pfdhps* están fuertemente asociados con la resistencia a SP. Un cuadro totalmente diferente se observa en el África sub-sahariana, donde no solo se observa que ocurren mutaciones en estos genes en grupos de combinaciones diferentes a los observados en América del Sur (Figura N° 2), sino que además la mayoría de las infecciones son policlonales y, por lo tanto, no es posible determinar si es que las mutaciones en los dos genes residen en los mismos parásitos dentro de una infección simple. Tales infecciones policlonales también pueden ser con frecuencia infecciones mixtas en el locus de interés (i.e., infecciones individuales que portan algunos parásitos con mutaciones específicas en codones de *Pfdhfr* o bien de *Pfdhps* y algunos parásitos sin mutaciones en estos codones (51).

Debido a la complicada naturaleza generada por los datos moleculares obtenidos por análisis específico de mutaciones, la mayoría de estudios de campo se han limitado a reportar las frecuencias de las mutaciones y, en algunos casos a describir las asociaciones entre mutaciones específicas o grupos de mutaciones y las diferentes clasificaciones clínicas de resultados del tratamiento, en este caso el uso de instrumentos estadísticos ha sido muy útil, sobre todo las técnicas de análisis multivariado.

La estadística contribuye a expandir los horizontes de la investigación médica y es así que los investigadores clínicos en particular, necesitan del análisis multivariado debido a que la mayoría de enfermedades tienen múltiples causas y la prognosis es usualmente determinada por un gran numero de factores, incluso las enfermedades infecciosas que se sabe son causadas por un patógeno único, un numero de factores afectan ya sea a un individuo expuesto que se enferma, incluyendo las características del agente patógeno (la virulencia de la cepa), la ruta de exposición (vía sanguínea), la intensidad de la exposición (tamaño de inóculo, y la respuesta del hospedero (defensa inmunológica) (24).

En consecuencia, el análisis multivariado es una herramienta estadística que permite determinar las contribuciones únicas de varios factores a un resultado clínico o un evento único; existen tres tipos de análisis multivariados que se usan en investigación clínica: regresión lineal múltiple, la regresión logística múltiple y la regresión de riesgos proporcionales (Cox) (25).

La regresión logística es una técnica estadística multivariante que nos permite estimar la relación existente entre una variable dependiente no continua, en particular dicotómica, que describe una respuesta en forma de dos posibles eventos (por ejemplo: padecer o no una enfermedad), y un conjunto de variables independientes, predictoras (por ejemplo fumar, edad).

El modelo de regresión logística binaria puede resultarnos de gran utilidad para: 1) estimar la probabilidad de que se presente el evento de interés (por ejemplo: enfermar); y 2) poder evaluar la influencia que cada variable independiente tiene sobre la respuesta, en términos de OR. Una ventaja del OR es que es invariante (no dependiente) ya sea que nos enfoquemos en la ocurrencia del evento o en la no ocurrencia de este. Si el OR de un evento se desvía sustancialmente del 1, el OR del evento que no sucedió también se desviara sustancialmente del 1 pero en la dirección opuesta.

En los últimos años el OR ha sido usado ampliamente en reportes

médicos y se debe a tres razones. Primero, el OR provee un estimado (con un intervalo de confianza) para las relaciones entre dos variables binarias (“sí o no”). Segundo, nos permite examinar los efectos de otras variables en esas relaciones, usando la regresión logística (1). Tercero, nos da una interpretación especial y muy conveniente en los estudios caso-control (4,12).

Varias mutaciones puntuales in *Pfdhfr* y *Pfdhps* han sido asociadas con falla del tratamiento con SP en África (27, 41,42, 48, 49, 68). El análisis univariado ha demostrado que el triple mutante dhfr Asn108/Ile51/Arg59 o el doble mutante en *Pfdhps* Gli437/Glu540 o que el quíntuple mutante tanto en *Pfdhfr* y *Pfdhps* están todos asociados con falla al tratamiento de pacientes con SP (27, 42, 68).

El análisis de regresión logística fue usado en este trabajo de investigación para identificar los grupos de mutaciones que estaban asociadas a la falla o éxito del tratamiento con SP y así para identificar las interacciones existentes. De esta manera las infecciones causadas por parásitos con 3M en *Pfdhfr* y 2M o 3M en *Pfdhps* estaban fuertemente asociadas con la falla al tratamiento con SP, de manera similar a observaciones realizadas por Kublin et al en 2002 en muestras procedentes del África.

Con la finalidad de analizar si existía asociación entre los datos *in vivo* e *in vitro* (marcadores moleculares), se confeccionaron un total de 6 tablas. Al analizar los resultados de la primera tabla del total de pacientes clasificados según respuesta clínica, se encontró valores de OR para todos los genotipos analizados (DHFR, DHPS y la combinación DHFR/DHPS), con intervalos de confianza y *p* valor significativos. Los resultados no fueron tan exitosos cuando se uso la clasificación parasitológica ya que no se pudo determinar valores de OR para DHPS 3M, ni para la combinación DHFR/DHPS 6M. Si observamos los datos obtenidos de Padre Cocha encontramos que al igual que el total de pacientes analizados, solo se obtienen valores OR para DHFR 3M y DHPS2M, no habiendo valores para DHPS 3M, ni para la combinación DHFR/DHPS 6M, por no haber casos sensibles a SP por lo tanto era imposible comparar a la poblaciones en estudio basándonos en este dato.

De otro lado, si analizamos los datos de Caballococha, encontramos valores de OR solo cuando se ejecuta la clasificación clínica, no así cuando se analiza los datos según clasificación parasitológica. Basado en estas evidencias es que decidimos tomar la clasificación clínica para la determinación de la asociación que estábamos buscando. En general todos los valores de OR obtenidos son sumamente altos para confirmar la existencia de la asociación que estábamos buscando.

En general, el riesgo de falla de tratamiento cuando el parásito causante de la infección inicial portaba el “séxtuple mutante” 6M es más alto (OR 93,44, $p < 0.001$) que cuando el parásito tenía solo el “triple mutante” 3M en DHFR (OR 18,87, $p < 0,001$) y aun mucho mayor que cuando se detecta 3M en DHPS al ser el mismo del genotipo séxtuple mutante DHFR/DHPS (OR 93,44, $p < 0001$).

Son pocos los estudios realizados con el objetivos de encontrar asociación de marcadores moleculares y respuesta clínica *in vivo*, el mas completo es el reportado por Kublin et al (2002), en este estudio longitudinal de eficacia *in vivo* a SP y CD para el tratamiento de malaria no complicada por *P.f.*, se analizaron los genotipos en *Pfdhfr* y *Pfdhps* y respuesta clínica en muestras pre-tratamiento, usando un sistema estandarizado para interpretación de resultados del PCR. En este estudio se determino que la presencia en conjunto de 5 mutaciones en *Pfdhfr* y *Pfdhps* que se encuentran en África, estaban fuertemente asociadas con la falla del tratamiento con SP y que había una interacción estadística entre las mutaciones en ambos genes (27).

De otro lado debemos considerar que la correlación entre los marcadores moleculares de la resistencia a SP y los resultados de ensayos clínicos ha sido conflictiva debido a que los estudios de campo le han dado solo relativa importancia a las diferentes mutaciones que median la falla del tratamiento con SP. Muchos estudios previos se han visto limitados por el pequeño tamaño muestras, bajos niveles de resistencia a SP, y medidas parasitologicas mas no clínicas del resultado clínico final y muchas de estas limitaciones fueron evaluadas en el estudio que es parte de nuestra referencia llevado a cabo por Kublin en Malawi y en el que se recomienda que los centros

regionales de investigación en Africa usen los analisis de marcadores moleculares en busca del quintuple mutante, aunque por la asociación encontrada bastaría con analizar dos alelos (*Pfdhfr* Arg59 y *Pfdhps* Glu540) que pueden predecir la presencia del quintuple mutante con alto grado de certidumbre (28).

Sin embargo, el hecho de que la resistencia intrínseca del parásito no sea el único factor determinante del resultado clínico final en la mayor limitación y el reto que los científicos que trabajan en malaria enfrentan en áreas donde esta infección es endémica, y que tienen que considerar al intentar adoptar a estos marcadores moleculares para vigilancia epidemiológica de la malaria resistente causada por *P. falciparum*.

La respuesta de los pacientes al tratamiento con drogas antimaláricas depende de otros factores como la inmunidad del hospedero, los que en muchas áreas endémicas aumenta con la edad, según hemos comprobado al tomar interés en el grupo de niños mayores de 5 años incluidos es el presente estudio y que fueron sensibles a SP a pesar de portar al alelo Asn 108, lo que no sucedió con los niños menores de 5 años que fallaron principalmente con resistencias RIII y que presentaban genotipos 5M y 6M. Por lo tanto el estatus inmune de pacientes tratados con CQ o SP puede ciertamente modificar las relaciones existentes entre la presencia de los marcadores moleculares de resistencia a estas drogas y el resultado clínico final (22), otros factores pueden ser el estado nutricional, las enfermedades que afecten al pacientes aparte de malaria, y la absorción de los antimaláricos y su metabolismo (26).

Consideramos que el uso de los marcadores moleculares asociados a resistencia in vivo a SP son definitivamente útiles, por ejemplo cuando hay que decidir la introducción de un nuevo antimalárico en un área determinada, por ejemplo para decidir el uso de otros medicamentos basados en sulfas como cloproguanil-dapsona(CD) o Lapdap™, que surgió de estudios realizados en África del Este en los 1980s, ambos componentes actúan sinérgicamente sobre las enzimas de la ruta de folatos (ejem: DHFR y DHPS)(88)

La triazina activa de lapudrine (clorcicloguanil) es efectiva contra parásitos que tienen múltiples mutaciones en *Pfdhfr*, así pues este podría ser un potencial nuevo tratamiento para malaria no complicada causada por *P. falciparum*, ya que además tiene una vida media mucho más corta en el cuerpo humano comparado con SP, 12 hr. para clorproguanil y 24hr. para dapsona versus 81hr. para pirimetamina y 116hr para sulfadoxina, una característica que permite preveer una baja tendencia a la selección de cepas que finalmente conduce a la fármaco resistencia (20). Por lo tanto es visto como un reemplazo alternativo a SP, ya que **cuando** el parásito llega a ser virtualmente insensible a pirimetamina debido a una serie de 3 mutaciones en *Pfdhfr* (Asn108, Ile51 y Arg59), clorproguanil todavía es activo. Existen razones para creer que las mutaciones en *Pfdhps* solo ocurren después que se manifiestan las mutaciones en *Pfdhfr*, ya que *P. falciparum* se hace insensible a CD sólo cuando una cuarta mutación, Leu164 ha ocurrido resultando en el patrón Asn108, Ile51, ArgC59 y Leu164. En consecuencia si en 1999, en la región Loreto existía el alelo mutante Ile164, no sería posible usar este antimalárico, pero deberíamos aplicar criterios de dinámica de fármaco resistencia y considerar la idea que la sensibilidad puede haberse recuperado desde Agosto 1999 en que se dejó de usar en la región Loreto (39).

Es más, con fines de vigilancia inicial se podría analizar el alelo *Pfdhfr* Ile164, como de hizo en África (81), donde este alelo no ha sido detectado aun. Aquí encontramos la gran ventaja del uso de los marcados moleculares ya que consideramos que al no haber presión del uso de SP, los genotipos podría involucionar y ser nuevamente sensibles, por esta razón es que la vigilancia de la evolución de las mutaciones en *Pfdhfr* y *Pfdhs* es importante para efectos de políticas de salud en uso de antimaláricos en el Perú.

Bloland menciona que las técnicas moleculares estaban en proceso de desarrollo y validación y que todavía se consideraba difícil poder establecer la asociación entre las mutaciones estudiadas y la real resistencia al antimalárico en estudio, en especial cuando la resistencia implicaba a mas de un locus en un gen o a múltiples mutaciones, mencionando que de resolverse las dificultades estas serían una herramienta valiosa para el monitoreo, ocurrencia,

diseminación o intensificación de la fármaco resistencia (5).

En un esfuerzo común los países que comparten territorio de la Selva Amazónica en América Latina e incluso el Caribe, podrían compartir los datos obtenidos por los diferentes grupos de investigación que estudian prevalencia de marcadores moleculares de alelos que determinan resistencia a medicamentos antimaláricos, así se podría tener una base de datos común disponible para poder discernir los cambios en tiempo y espacio, muy similar a la que brinda el Proyecto MARA (*Mapping Malaria Risk in Africa*) (66,67).

Así vamos llegando a la conclusión que los marcadores moleculares necesitan ser llevados del nivel de diagnóstico al que se ha llegado hasta ahora para dar un paso adelante hacia la vigilancia de la resistencia a un nivel de poblaciones, aprovechando la gran ventaja de la facilidad de recolección de muestras.

Debemos enfatizar que usados como complemento de las pruebas de eficacia *in vivo*, los marcadores moleculares podrían ser usados como mapeo a gran escala y así lograr una estimación de fármaco resistencia. Por lo tanto las pruebas *in vivo* podrían ser ejecutadas en lugares específicos basados en datos moleculares para dar un estimado mas preciso de situación actuales de prevalencia de fármaco resistencia (70).

Si el dejar de usar un medicamento resultara en la desaparición de los parásitos resistentes a este medicamento entonces se haría posible considerar la idea de rotar a los pocos medicamentos antimaláricos económicos disponibles el quitar la presión del uso de la droga puede comprometer o no las capacidades ("fitness") de los microorganismos resistentes y resultar en la selección de fenotipos sensibles al fármaco. Un desuso parcial de la droga, la resistencia cruzada a otras drogas similares y la presencia de mutaciones compensatorias que reducen el costo de la resistencia a las capacidades de adaptación ("fitness") del microbio sin afectar la fármaco resistencia en si, permitirían la persistencia de la fármaco resistencia aun después de que el fármaco antimicrobiano haya sido puesto fuera de uso. Un buen ejemplo de

recuperación de la sensibilidad es el caso de Malawi, un caso modelo de estudios de monitoreo de fármaco resistencia y de formulación de políticas de malaria basado en evidencias; el primer país en África sub-sahariana que dejó de usar CQ en 1993 para pasar a SP, y los reportes del 2000 indicaban que la prevalencia del marcador *Pfcr*t 76T había reducido dramáticamente, en 2001 CQ era 100% eficaz *in vivo* e *in vitro* y no se detectó el alelo *Pfcr*t 76T (50).

La recuperación de la fármaco sensibilidad no quiere decir que la droga que recupera su eficacia pueda ser usada después en monoterapia, ese el caso de CQ, que a pesar de ser sensible de nuevo en Malawi no debería ser usada como tal ya que este país esta rodeado de países vecinos como Mozambique y Zambia, donde todavía persiste la resistencia a CQ, y que generaría la re emergencia de la R una vez reintroducida en Malawi. En cambio la terapia de combinación con CQ será la elección en estos casos (29). Este principio podría ser usado para reintroducir SP una vez que se demostrara que su desuso por un cierto número de años le ha devuelto su eficacia.

En el afán de contribuir a la detección de la fármaco resistencia, la introducción del PCR en tiempo real (Real time PCR) y la posibilidad de cuantificar números de copias puede brindar nuevas perspectivas para el uso de los marcadores moleculares asociados a resistencia a antiamaláricos en epidemiología (79), así en el futuro sería posible usar los marcadores y cuantificar el número de copias como ya se ha ensayado con el gen *Pfmdr*1 postulando a esta última estrategia como un nuevo marcador molecular (46).

VII CONCLUSIONES

- 1) Se determinó, que el genotipo con mayor número de mutaciones se encontraba en el gen *Pfdhfr*, codones S108N, N51I y I164L y en combinación con mutaciones en *Pfdhps* en los codones A437G, A581G y K540E.
- 2) Los genotipos asociados a fármaco resistencia son una combinación de 6 mutaciones (6M), 3 en el gen DFHR Asn108, Ile51 y Leu164 así como 3 en el gen DHPS, A437G, K540E, A581G, según se demostró por análisis de regresión logística.
- 3) Existe una fuerte asociación entre los genotipos en los genes *Pfdhfr* y *Pfdhfr* y la respuesta *in vivo* al tratamiento con SP
- 4) Existe diferencia entre el grupo de parásitos circulantes en ambas localidades, el genotipo 5M predomina en las cepas sensibles a SP provenientes de Caballococha
- 5) Este estudio provee evidencia que los marcadores moleculares pueden ser usados como marcadores moleculares de fármaco resistencia y que pueden servir para vigilancia epidemiológica y promoción de formulación de políticas de terapia antimalárica basada en evidencias.

VIII. RECOMENDACIONES

- 1) Considerar a estos resultados aplicables no solo a ciencia básica sino también en salud pública y epidemiología.
- 2) Considerar los resultados de marcadores moleculares para evaluación de la política de tratamiento de malaria no complicada en la región Loreto.
- 3) Usar el PCR anidado en Loreto para una evaluación anual de prevalencia de mutaciones del genotipo 6M en *Pfdhfr* y *Pfdhfr*.
- 4) Planificar estudios de secuenciamiento de *Pfdhfr* y *Pfdhfr* cada 3 años para determinar evolución y/o emergencia de nuevas mutaciones.
- 5) Realizar estudios de evolución y prevalencia del codón Ile164Leu en la región Loreto.
- 6) Evaluar el uso de análogos de la combinación SP, como la combinación cloproguanil-dapsona y considerar su implementación como terapia antimalárica en el Perú.
- 7) Considerar el uso de clorproguanil-dapsona más Artesunato para reducir resistencia, ante la prevalencia de la mutación Leu164 en la región amazónica.
- 8) Considerar el uso de estos marcadores moleculares aplicados a *P. vivax* que aun no puede ser mantenido en cultivo continuo *in vitro* y por lo tanto todavía debemos basar las políticas de salud en estudios *in vivo*.

IX. BIBLIOGRAFIA

1. Abaira V Medidas del efecto de un tratamiento (II): odds ratio y número necesario para tratar.. SEMERGEN 27: 418-420. 2001.
2. Aramburu Guarda J, Ramal Asayag C, Witzig Malaria reemergence in the Perú vian Amazon region. Emerg Infect Dis. 1999 Mar-Apr;5(2):209-15.
3. Ballou WR, Arevalo-Herrera M, Carucci D, Richie TL, Corradin G, Diggs C, Druilhe P, Giersing BK, Saul A, Heppner DG, Kester KE, Lanar DE, Lyon J, Hill AV, Pan W, Cohen JD., Update on the clinical development of candidate malaria vaccines, Am. J. Trop. Med. Hyg., 71(Suppl 2), 2004, pp. 239-247en
4. Bland JM, Altman DG. Statistics notes. The odds ratio. BMJ. 2000 May 27;320(7247):1468. Review
5. Bloland P. Drug resistance in malaria [WHO/CDS/CSR/DRS/2001.4]. Geneva: World Health Organization, 2001.
6. BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO SEMANAL, Oficina General de Epidemiología (OGE), MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ. VOL. XIV - Nº 13 - 2005 Lima, Perú del 27 de Marzo al 02 de Abril del 2005.
7. Brooks DR, Wang P, Read M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE. Sequence variation of the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, Plasmodium falciparum, with differing resistance to sulfadoxine. Eur J Biochem. 1994 Sep 1;224(2):397-405
8. Calderón G, Fernández R, Valle J. Especies de la fauna anofelina, su distribución y algunas consideraciones sobre su abundancia e infectividad en el Perú. Revista Perú ana de Epidemiología 1995;8:5-23.
9. Cortese JF, Plowe CV. Antifolate resistance due to new and known Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase mutations expressed in yeast. Mol Biochem Parasitol. 1998 Aug 1;94(2):205-14.
10. Cortese JF, Caraballo A, Contreras CE, Plowe CV. Origin and dissemination of Plasmodium falciparum drug-resistance mutations in South America. J Infect Dis. 2002 Oct 1;186(7):999-1006. Epub 2002 Sep 9.
11. Da Silva J., Richtmann R; Vaccines under development: group B

- streptococcus, herpes-zoster, HIV, malaria and dengue, J. Pediatr (Rio J). 2006 ;82(3 Suppl):S115-24:
12. Davies HT, Crombie IK, Tavakoli M. When can odds ratios mislead? BMJ. 1998 Mar 28;316(7136):989-91. Review
 13. Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, Kayentao K, Doumbo S, Diourte Y, Dicko A, Su XZ, Nomura T, Fidock DA, Wellems TE, Plowe CV, Coulibaly D. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. N Engl J Med. 2001 Jan 25;344(4):257-63.
 14. Durand S., Marquino W, Ruebush T.K. et al, Efficacy of chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated plasmodium falciparum malaria in the north west of the department of Loreto, Abstract 322, 53rd meeting ASTMH, Miami, FL, USA, 2004.
 15. Eldin de Pecoulas P, Basco LK, Abdallah B, Dje MK, Le Bras J, Mazabraud A. Plasmodium falciparum: detection of antifolate resistance by mutation-specific restriction enzyme digestion. Exp Parasitol. 1995 May;80(3):483-487
 16. Fernández R, Carbajal F, Quintana J, Chauca H, Watts DM. Presencia del A. (N) darlingi (Diptera: Culicidae), en alrededores de la ciudad de Iquitos, Loreto-Perú. Sociedad Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales 1996;5:10-2.
 17. Fidock D. , Rosenthal P., Croft S., Brun R., And Nwaka S., Antimalarial Drug Discovery:Efficacy Models For Compound Screening, Nature Reviews | Drug Discovery , Volume 3, Jun 2004, pag 509-520
 18. Fidock DA, Nomura T, Talley AK, Cooper RA, Dzekunov SM, Ferdig MT, Ursos LM, Sidhu AB, Naude B, Deitsch KW, Su XZ, Wootton JC, Roepe PD, Wellems TE. Mutations in the P. falciparum digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance. Mol Cell. 2000 Oct;6(4):861-71.
 19. Foote SJ, Galatis D, Cowman AF., Amino acids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of Plasmodium falciparum involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Apr;87(8):3014-7.
 20. Gregson A, Plowe CV. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. Pharmacol Rev. 2005 Mar;57(1):117-45. Review.

21. Gutiérrez S, Arróspide N. Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico De Malaria. Instituto Nacional de Salud, SERIE DE NORMAS TÉCNICAS N°39, Lima, Perú , 2003.
22. Happi CT, Gbotosho GO, Folarin OA, Akinboye DO, Yusuf BO, Ebong OO, Sowunmi A, Kyle DE, Milhous W, Wirth DF, Oduola AM. Polymorphisms in *Plasmodium falciparum* dhfr and dhps genes and age related in vivo sulfadoxine-pyrimethamine resistance in malaria-infected patients from Nigeria. *Acta Trop.* 2005 Sep;95(3):183-93.
23. Huaman MC, Roncal N, Nakazawa S, Long TT, Gerena L, Garcia C, Solari L, Magill AJ, Kanbara H. Polymorphism of the *Plasmodium falciparum* multidrug resistance and chloroquine resistance transporter genes and in vitro susceptibility to aminoquinolines in isolates from the Peruvian Amazon.
24. Katz M, *Multivariable Analysis: A Practical Guide for Clinicians*, Cambridge University Press, 1999.
25. Katz M, *Multivariable Analysis: A Primer for Readers of Medical Research*, *Ann Intern Med.* 2003;138:644-650 .
26. Kublin JG, Witzig RS, Shankar AH, Zurita JQ, Gilman RH, Guarda JA, Cortese JF, Plowe CV. Molecular assays for surveillance of antifolate-resistant malaria. *Lancet.* 1998 May 30;351(9116):1629-30.
27. Kublin JG, Dzinjalama FK, Kamwendo DD, Malkin EM, Cortese, Molyneux ME, Winstanley PA, and Plowe CV. Molecular markers for failure of sulfadoxine-pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *J Infect Dis.* 2002 Feb 1;185(3):380-8.
28. Kyabayinze D, Cattamanchi A, Kanya MR, Rosenthal PJ, Dorsey G. Validation of a simplified method for using molecular markers to predict sulfadoxine-pyrimethamine treatment failure in African children with *falciparum* malaria. *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Sep;69(3):247-52.
29. Laufer MK, Thesing PC, Eddington ND, Masonga R, Dzinjalama FK, Takala SL, Taylor TE, Plowe CV. Return of chloroquine antimalarial efficacy in Malawi. *N Engl J Med.* 2006 Nov 9;355(19):1959-66.
30. Le Bras J, Durand R. The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharmacol.* 2003 Apr;17(2):147-

53. Review.

31. Leinecke, T., et al(1997) In vivo resistance to pyrimethamine/sulfadoxine for the treatment of *Plasmodium falciparum* in Perú , 46th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH), Orlando, FL, USA
32. Magill AJ, Garcia C, Solari L Ylquimiche L, Vasquez M, Carey C Calampa C and Llanos-Cuentas A., Poster #329: Therapeutic efficacy of Pyrimethamine-Sulfadoxine in The Perú vian Amazon , American Society of Topical Medicine and Hygiene, Washington DC,November 28th - December 2nd, 1999
33. Magill AJ, Zegarra J, Garcia C, Marquino W, Ruebush TK 2nd. Efficacy of sulfadoxine-pyrimethamine and mefloquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Amazon basin of Perú .Rev Soc Bras Med Trop. 2004 May-Jun;37(3):279-81.
34. Marquiño W., Ruebush TK 2nd, et.al. Efficacy of mefloquine and a mefloquine-artesunate combination therapy for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in the Amazon Basin of Perú . Am. J. Trop. Med. Hyg. 2003 May;68(5):608-12.
35. Marquiño W. , Macarthur J., Ruebush TK, et.al.Efficacy of Chloroquine, Sulfadoxine-Pyrimethamine, and Mefloquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria on the north coast of Perú Am.J.Trop.Med.Hyg. 2003, Vol. 68, No. 1, 120-123.
36. Marquiño W, Ylquimiche L, Hermenegildo Y, Palacios AM, Falconi E, Cabezas C, Arrospide N, Gutierrez S, Ruebush TK 2nd. Efficacy and tolerability of artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine and sulfadoxine-pyrimethamine alone for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Perú . Am. J. Trop. Med. Hyg. 2005 May;72(5):568-72.
37. Matuschewski K. Vaccine development against malaria Current Opinion in Immunology 2006, 18:449-457
38. Mookherjee S., Howard V, Nzila-Mouanda A, Watkins W, Sibley CH., Identification and analysis of dihydrofolate reductase alleles from *Plasmodium falciparum* present at low frequency in polyclonal patient samples. Am J Trop Med Hyg. 1999 Jul;61(1):131-40.

39. Neyra D., Cabezas C., Ruebush II TK, El proceso de adecuación y cambio en la política del tratamiento de la malaria por *Plasmodium falciparum* en el Perú, 1990-2001 *Rev Perú Med Exp Salud Publica* 2003; 20 (3)
40. Noedl H, Wongsrichanalai C, Wernsdorfer WH. Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. *Trends Parasitol.* 2003 Apr;19(4):175-81. Review.
41. Nzila A, Ochong E, Nduati E, Gilbert K, Winstanley P, Ward S, Marsh K. Why has the dihydrofolate reductase 164 mutation not consistently been found in Africa yet? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005 May;99(5):341-6. Review.
42. Nzila AM, Mberu EK, Sulo J, Dayo H, Winstanley PA, Sibley CH, Watkins WM. Towards an understanding of the mechanism of pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: genotyping of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of Kenyan parasites. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Apr;44(4):991-6.
43. Peek R, VAN Gool T, Panchoe D, Greve S, Bus E, Resida L., Drug resistance and genetic diversity of *Plasmodium falciparum* parasites from Suriname. *Am J Trop Med Hyg.* 2005 Nov;73(5):833-8.
44. Peterson DS, Walliker D, Wellems TE. Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Dec;85(23):9114-8.
45. Peterson DS, Milhous WK, Wellems TE. Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Apr;87(8):3018-22.
46. Pickard AL, Wongsrichanalai C., Purfield A et al, Resistance to antimalarials in South East Asia and genetic polymorphisms in *pfmdr1*. *antimicrob agents Chemoth* 2003; 47:2418-2423
47. Pillai D. Hajar G.I Montoya Y., Marquiño W., RuebushTK II, Wongsrichanalai Ch, and Kain K. Lack of prediction of mefloquine and mefloquine-artesunate treatment outcome by mutations in the *Plasmodium falciparum* multidrug resistance 1 (*pfmdr1*) gene for *Plasmodium falciparum* malaria in Peru *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol. 68, No. 1, 107-110.
48. Plowe CV , Djimde A. et al. Pyrimethamine and proguanil resistance-

- confering mutations in *P. falciparum* dihydrofolate reductase: polymerase chain reaction methods for surveillance in Africa. *Am.J. Trop. Med Hyg.* 1995, 52(6), pp 565-568.
49. Plowe CV, Cortese JF, Djimde A, Nwanyanwu OC, Watkins WM, Winstanley PA, Estrada-Franco JG, Mollinedo RE, Avila JC, Cespedes JL, Carter D, Doumbo OK. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance. *J Infect Dis.* 1997 Dec;176(6):1590-6.
 50. Plowe CV. Monitoring antimalarial drug resistance: making the most of the tools at hand. *J Exp Biol.* 2003 Nov;206(Pt 21):3745-52. Review.
 51. Plowe CV, Kublin JG, Dzinjalama FK, Kamwendo DS, Mukadam RA, Chimpeni P, Molyneux ME, and Taylor TE (2004) Sustained clinical efficacy of sulfadoxinepyrimethamine for uncomplicated *falciparum* malaria in Malawi after 10 years as first line treatment: five year prospective study. *BMJ* 328:545.
 52. QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook, Qiagen products, September 2001.
 53. Rathod PK, Phillips MA. Prized malaria drug target nailed. *Nat Struct Biol.* 2003 May;10(5):316-8.
 54. Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2000 Feb 24;403(6772):906-9.
 55. Roper C, Pearce R, Bredenkamp B, Gumede J, Drakeley C, Mosha F, Chandramohan D, Sharp B. Antifolate antimalarial resistance in southeast Africa: a population-based analysis. *Lancet.* 2003 Apr 5;361(9364):1174-81.
 56. Roper C, Pearce R, Nair S, Sharp B, Nosten F, Anderson T. Intercontinental spread of pyrimethamine-resistant malaria. *Science.* 2004 Aug 20;305(5687):1124.
 57. Roper MH, Torres RS, Goicochea CG, Andersen EM, Guarda JS, Calampa C, Hightower AW, Magill AJ. The epidemiology of malaria in an epidemic area of the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2000 Feb;62(2):247-56.

58. Ruebush TK 2nd, Marquiño W, Zegarra J, et al. Practical aspects of in vivo antimalarial drug efficacy testing in the Americas, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2003 Apr;68(4):391-7.
59. Ruebush TK 2nd, Zegarra J, Cairo J, Andersen EM, Green M, Pillai DR, Marquiño W, Huilca M, Arevalo E, Garcia C, Solary L, Kain KC. Chloroquine-resistant *Plasmodium vivax* malaria in Perú . *Am J Trop Med Hyg.* 2003 Nov;69(5):548-52.
60. Ruebush TK, Levin A, Gonzaga V, Neyra D, Marquino W. Evaluation of a simple operational approach for monitoring resistance to antimalarial drugs in Perú . *Trop Med Int Health.* 2003 Oct;8(10):910-6.
61. Ruebush TK 2nd, Neyra D, Cabezas C. Modifying national malaria treatment policies in Perú . *J Public Health Policy.* 2004;25(3-4):328-45.
62. Salas C., Magill A., Santolalla M., Lucas C and Bacon D. : Significant association between the presence of the Bolivia repeat insertion in the dhfr gene of *Plasmodium falciparum* and in vivo resistance to Sulfadoxine-Pyrimethamine (SP) in isolates collected in the Amazon region of Perú . Poster # 456, ASTMH 55th meeting, Atlanta, GA. USA, 11-16November, 2006
63. Schmider N, Peyerl-Hoffmann G, Restrepo M, Jelinek T. Short communication: point mutations in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes of *Plasmodium falciparum* isolates from Colombia. *Trop Med Int Health.* 2003 Feb; 8(2):129-32.
64. Sherman I, *Molecular Approaches to Malaria*, ISBN 1-55581-330-5 American Society for Microbiology, 2005
65. Sibley CH, Hyde JE, Sims PF, Plowe CV, Kublin JG, Mberu EK, Cowman AF, Winstanley PA, Watkins WM, Nzila AM. Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends Parasitol.* 2001 Dec;17(12):582-8. Review.
66. Sibley CH, Hunt SY. Drug resistance in parasites: can we stay ahead of the evolutionary curve? *Trends Parasitol.* 2003 Nov;19(11):532-7. Review.
67. Sibley CH, Ringwald P. , A database of antimalarial drug resistance, *Malaria Journal* 2006, 5:48
68. Staedke SG, Sendagire H, Lamola S, Kanya MR, Dorsey G, Rosenthal PJ

- Relationship between age, molecular markers, and response to sulphadoxine-pyrimethamine treatment in Kampala, Uganda. *Trop Med Int Health*. 2004 May;9(5):624-9.
69. Stennies GM et al.(1999) Efficacy and molecular epidemiology of chloroquine and sulfadoxine/pyrimethamine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* infections in the Peruvian Amazon, 48th Annual meeting of the ASTMH, Washington DC, USA.
 70. Talisuna AO, Bloland P, D'Alessandro U. History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2004 Jan;17(1):235-54. Review.
 71. Triglia,T., Foote,S.J., Kemp,D.J. and Cowman,A.F.Amplification of the multidrug resistance gene *pfmdr1* in *Plasmodium falciparum* has arisen as multiple independent events. *Mol. Cell. Biol*. 11 (10), 5244-5250 (1991).
 72. Triglia T, Cowman AF. Primary structure and expression of the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jul 19;91(15):7149-53.
 73. Triglia T, Menting JG, Wilson C, Cowman AF. Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 9;94(25):13944-9.
 74. Vasconcelos KF, Plowe CV, Fontes CJ, Kyle D, Wirth DF, Pereira da Silva LH, Zalis MG. Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of isolates from the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000 Sep-Oct; 95(5):721-8.
 75. Wang P, Brooks DR, Sims PF, Hyde JE. A mutation-specific PCR system to detect sequence variation in the dihydropteroate synthetase gene of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. 1995 Apr;71(1):115-25.
 76. Wang P, Lee CS, Bayoumi R, Djimde A, Doumbo O, Swedberg G, Dao LD, Mshinda H, Tanner M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE. Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum* monitored by sequence analysis of dihydropteroate synthetase and dihydrofolate reductase alleles in a large number of field samples of diverse origins. *Mol Biochem Parasitol*. 1997 Nov;89(2):161-77.
 77. Wang P, Read M, Sims PF, Hyde JE. Sulfadoxine resistance in the human

- malaria parasite *Plasmodium falciparum* is determined by mutations in dihydropteroate synthetase and an additional factor associated with folate utilization. *Mol Microbiol.* 1997 Mar;23(5):979-86.
78. Warhurst DC. Resistance to antifolates in *Plasmodium falciparum*, the causative agent of tropical malaria. *Sci Prog.* 2002;85(Pt 1):89-111. Review.
 79. Wernsdorfer W., Noedl H, Molecular markers for drug resistance in malaria: use in treatment, diagnosis and epidemiology., *Curr Opin Infect Dis* 16:553-558, 2003.
 80. White NJ. Antimalarial drug resistance. *J Clin Invest.* 2004 Apr;113(8):1084-92. Review.
 81. Wichmann O, Jelinek T, Peyerl-Hoffmann G, Muhlberger N, Grobusch MP, Gascon J, Matteelli A, Hatz C, Laferl H, Schulze M, Burchard G, da Cunha S, Beran J, McWhinney P, Kollaritsch H, Kern P, Cuadros J, Alifrangis M, Gjørup I; European Network on Surveillance of Imported Infectious Diseases (TropNetEurop). Molecular surveillance of the antifolate-resistant mutation I164L in imported African isolates of *Plasmodium falciparum* in Europe: sentinel data from TropNetEurop. *Malar J.* 2003 Jun 25;2:17. Epub 2003 Jun 25.
 82. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis.* 2002 Apr;2(4):209-18. Review.
 83. World Health Organization. Assessment of Therapeutic Efficacy of Antimalarial Drugs for Uncomplicated *Falciparum* Malaria in Areas of Intense Transmission. WHO Document, WHO/MAL/96.1077, Geneva, 1996.
 84. World Health Organization, TDR news No59, June 1999.
 85. World Health Organization, Monitoring Antimalarial Drug Resistance WHO/CDS/CSR/EPH/2002.17 WHO/CDS/RBM/2002.39, Geneva, Switzerland 3-5 December 2001
 86. World Health Organization, 2003. Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated *falciparum* malaria. Geneva: WHO/CDS/CSR/RMB/2003.50.
 87. World Health Organization, Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to

Antimalarial drugs, Report on Global Monitoring 1996-1994, Geneva, WHO/HTM/MAL/2005.1103.

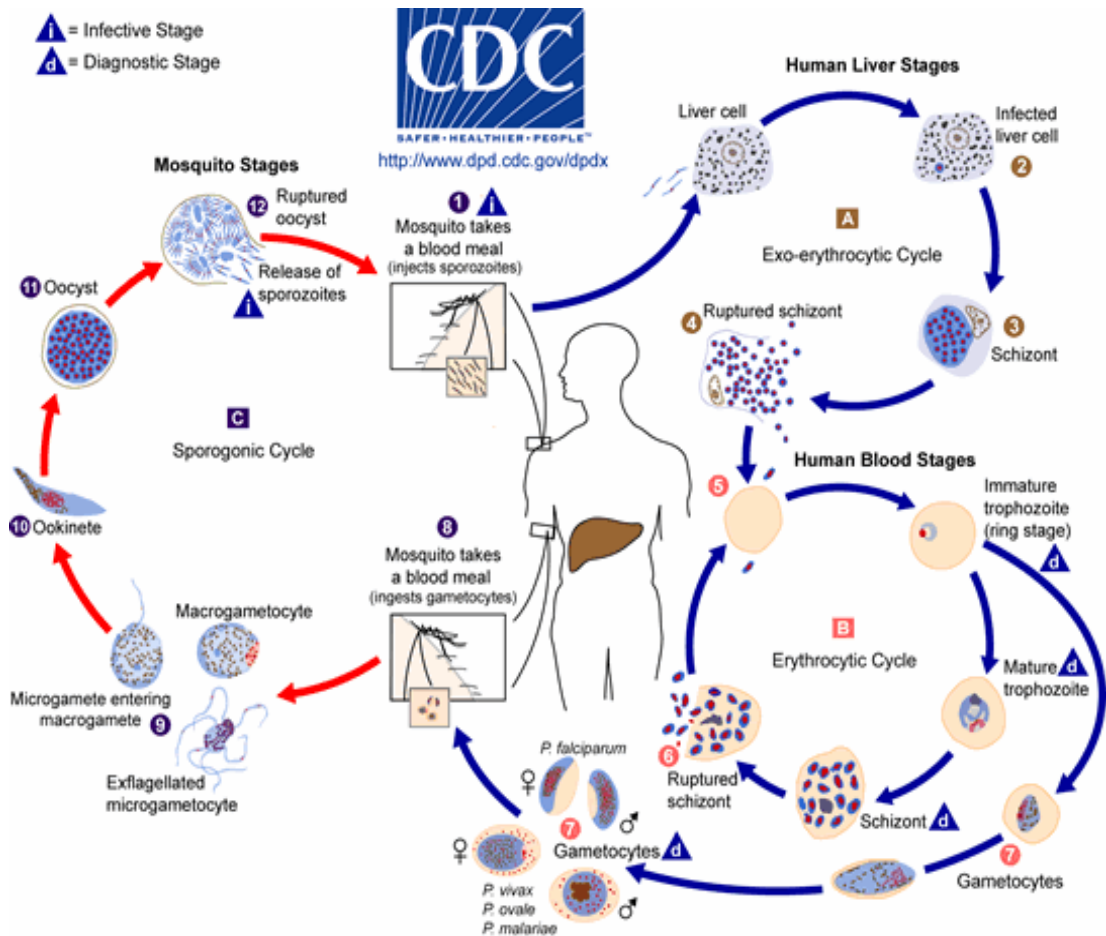
88. World Health Organization, Review of the safety of chlorproguanil–dapsone in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in Africa - Report of a Technical Consultation convened by WHO Geneva, 1–2 July 2004, WHO/HTM/MAL/2005.1106).
89. World Health Organization: Guidelines for the treatment of malaria WHO/HTM/MAL/2006.1108 Geneva, 2006.

X. ANEXOS

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°1 : Ciclo de vida de <i>Plasmodium sp.</i>	66
ANEXO N° 2 : Protocolo de Extracción de ADN a partir de muestras de sangre	67
ANEXO N° 3 : Oligonucleótidos usados para amplificación de codones de interés del gen <i>Pfdhfr</i> por PCR anidado.....	69
ANEXO N° 4 : Oligonucleótidos usados para amplificación de codones de interés del gen <i>Pfdhps</i> por PCR anidado	70
ANEXO N° 5 : Protocolo de Electroforesis en Geles de Agarosa	71
ANEXO N°6: Clasificación de los Estudios de Eficacia <i>in vivo</i> según Definiciones Tradicionales de Respuesta Parasitologica.....	72
ANEXO N° 7 : Clasificación de los Estudios de Eficacia <i>in vivo</i> según Determinación de Resultados Clínicos.....	73
ANEXO N° 8 Consentimiento Voluntario Escrito	74

ANEXO N°1 : Ciclo de vida de *Plasmodium sp*



Durante una picadura, un zancudo *Anopheles* hembra inocula esporozoitos al hospedero humano¹, estos infectan a las células hepáticas² y maduran hasta esquizontes³ que al romperse liberan merozoitos⁴. Luego de esta replicación inicial en el hígado (esquizogonia exo-eritrocítica^A), los parásitos sufren una multiplicación asexual en los eritrocitos (esquizogonia eritrocítica^B). Los merozoitos infectan a los eritrocitos⁵. Los trofozoitos en estado anular maduran a esquizontes, los que al romperse liberan a los merozoitos⁶. Algunos parásitos diferencian en estados eritrocíticos sexuales (gametocitos)⁷. Los parásitos sanguíneos son responsables de las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Los gametocitos, machos (microgametocitos) y hembras (macrogametocitos), son ingeridos por un zancudo *Anopheles* durante una picadura⁸. La multiplicación de los parásitos en el mosquito se conoce como ciclo esporogónico^C. Mientras que en el estómago del zancudo, los microgametos penetran a los macrogametos generando cigotos⁹. Los cigotos se hacen móviles y elongados (ookinetas)¹⁰ y al invadir la pared del intestino del zancudo se depositan y desarrollan en ooquistes¹¹. Los ooquistes crecen, revientan y liberan esporozoitos¹², estos siguen su ruta hasta las glándulas salivales del zancudo. La inoculación de los esporozoitos en un nuevo hospedero humano perpetúa el ciclo de vida de la malaria¹.

ANEXO N° 2 : Protocolo de Extracción de ADN a partir de muestras de sangre

Material

1. Kit de extracción de DNA QIAmp Mini kit
2. Minicolumnas de centrifugación
3. Tampón de extracción conteniendo agentes caotrópicos y detergente.
4. Tampón de lavado : Tris-EDTA y Etanol absoluto
5. H₂O libre de DNAsa, RNAasa

Método

Se procederá a la extracción de DNA a partir de sangre total, colectada con anticoagulante EDTA, que estuvo almacenada a -80°C .

1) Procedimiento de Lisis

- a) Pipetear 200 μL de sangre total en un microtubo de 1.5 mL.
- b) Agregar 20 μL de solución stock de proteasa QIAGEN y 200 μL de Buffer AL a la muestra.
- c) Mezclar inmediatamente por vortex durante 15 sec.
- d) NO se debe agregar proteasa QIAGEN directamente al buffer AL.
- e) Incubar a 56°C durante 10 min. Vortex cada 2 min.
- f) Agregar 200 μL de etanol a la muestra y mezclar otra vez por vortex.

2) Unión del DNA

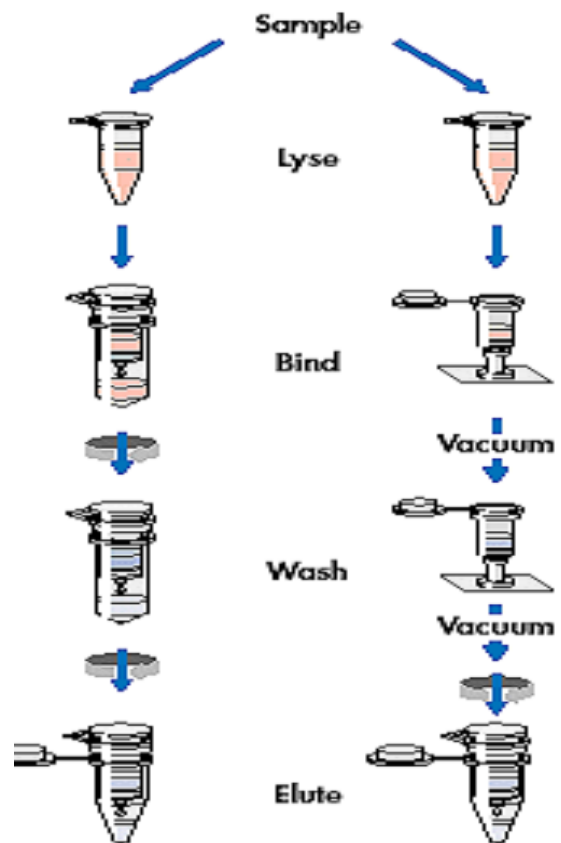
- a) Colocar la columna de centrifugación QIAamp® en el tubo colector de 2mL, (que vienen en el kit)
- b) Aplicar cuidadosamente la mezcla del paso 4 a la columna de centrifugación QIAamp® sin humedecer el borde del tubo, así se evita la contaminación cruzada.
- c) Centrifugar a 8000 RPM por 1 min.
- d) Colocar la columna de centrifugación QIAamp® en el tubo colector limpio de 2mL, (que viene en el kit). Descartar el tubo que contiene el filtrado.

3) Lavado

- a) Abrir cuidadosamente columna de centrifugación QIAamp®, Agregar 500 μL de buffer AW1 y Centrifugar a 8000 rpm por 1 min.
- b) Colocar la columna de centrifugación QIAamp® en el tubo colector limpio de 2mL, (que viene en el kit). Descartar el tubo columna que contiene el filtrado.
- c) Abrir cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp® y agregar otros 500 μL de Buffer AW2. Centrifugar a 14,000 RPM por 3 min.
- d) Colocar la columna de centrifugación QIAamp en un tubo de micro centrifuga de 1.5 mL. limpio. Descartar el tubo columna que contiene el filtrado.

C) Elusión

- Abrir cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp.
- Eluir el DNA con 200 μ l de buffer AE o bien agua destilada precalentada a 56°C. Se tomo la decisión de eluir con buffer AE, en volúmenes que fueron desde 70 hasta 150 μ l para concentrar el ADN y poder aplicar un solo protocolo para todas las muestras.
- Incubar a 70°C por 5 min.
- Centrifugar a 8000 RPM por 1 min
- Tomar la columna y descartarla.
- Cerrar el tubo de micro centrífuga
- Almacenar en refrigeración a -20°C.

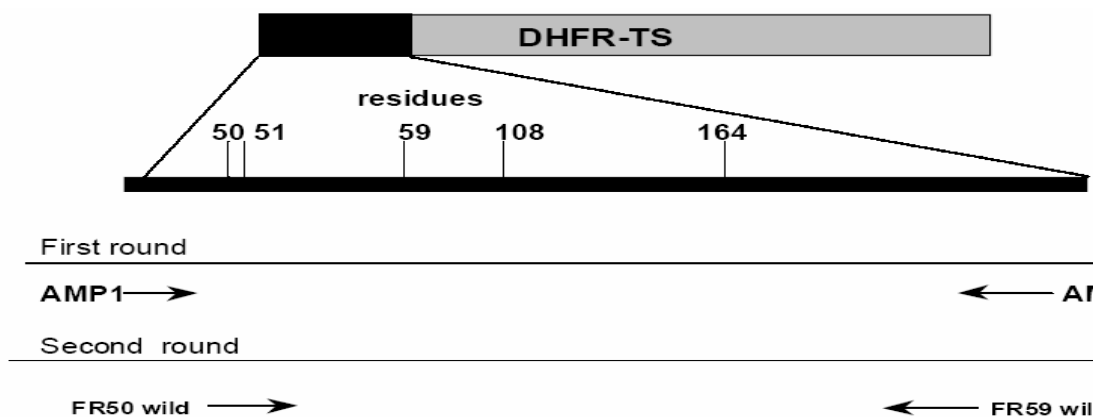


ADN genómico puro

**ANEXO N° 3 : Oligonucleótidos usados para amplificación de codones de interés
del gen *Pfdhfr* por PCR anidado**

Codón	Nombre	Secuencia	Tamaño
50	FR50w FR50m	5'TTA CCA TGG AAA TGT AA3' 5'TTA CCA TGG AAA TGT AT3'	570bp
51	FR51w FR51M	5'TTA CCA TGG AAA TGT AA3' 5'TTA CCA TGG AAA TGT AT3'	514bp
59	FR59m FR59W	5'ATG TTG TAA CTG CAC G3' 5'ATG TTG TAA CTG CAC A3'	190bp
108	DIA 3 DIA 9 DIA 12	5' GAA TGC TTT CCC AGC 3' 5' GAA TGC TTT CCC AGG 3' 5' GGA ATG CTT TCC CAG T 3'	339bp
164	DIA 13 DIA 14	5' CAA CGG AAC CTC CTA T 3' 5' CAA CGG AAC CTC CTA A 3'	505bp

Las secuencias fueron publicadas por Plowe et al. en J Infect Dis. 1997 Dec;176(6):1590-6. y Am.J. Trop. Med Hyg.1995, 52(6), pp 565-568.

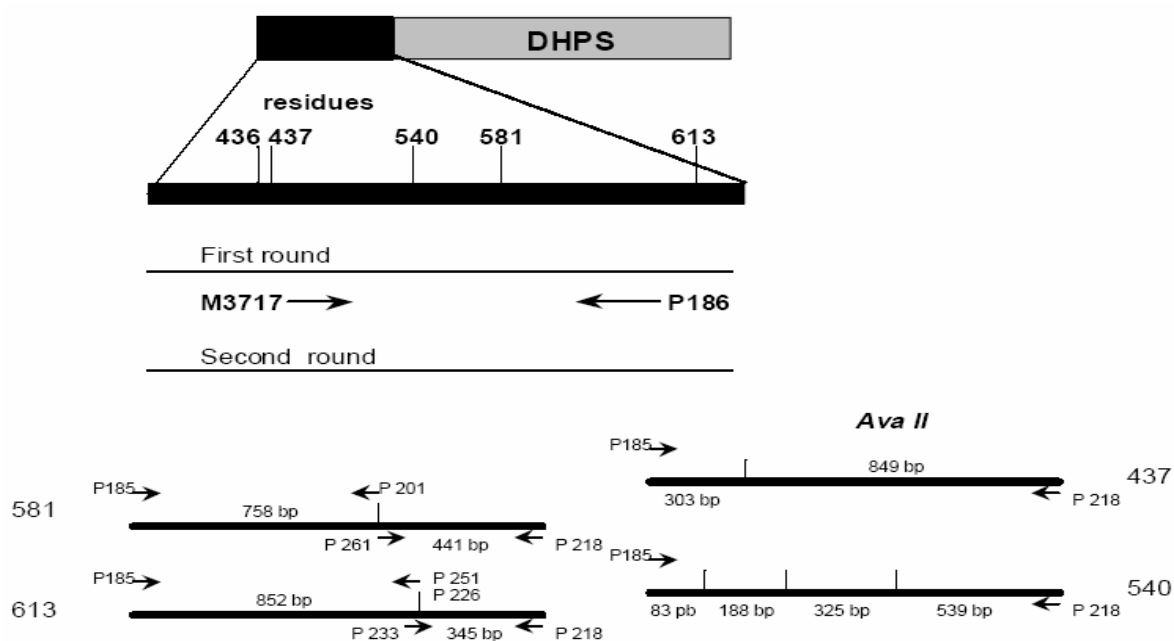


Referencia: Esquema tomado de Vasconcelos et al, Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000 Sep-Oct; 95(5):721-8. 2000

**ANEXO N° 4 : Oligonucleótidos usados para amplificación de codones de interés
del gen *Pfdhps* por PCR anidado**

Nombre	Secuencia	Codón	Tamaño
185 218	5'TGATACCCGAATATAAGC ATA ATG 3' 5' ATAATAGCTGTAGGAAGCAATTG 3'	436/437	
CD70 CD71	5'GGAAATCCACATACAATGGAAA3' 5'GTAGATTATCATAATTTGTTAGTAC3'	540	M: 636 bp W: 561 bp
201 261	5' AATAGATTGATCATGTTTCTTCC 3' 5' CTATTTGATATTGGATTAGGATTTTC 3'	581	W: 441 bp M: 758 bp
233 251	GGA TAT TCA AGA AAA AGA TIT ATa <u>G</u> T T-TG ATC AT-T CAT GCA ATG GcT	613S	W : 345 bp M: 849 bp
233 226	GGA TAT TCA AGA AAA AGA TIT ATa <u>G</u> G ATC AtT CAT GCA ATG GGA	613T	W : 345 bp

Referencia : Las secuencias fueron publicadas por Wang et al.: Mol Biochem Parasitol. 1995 Apr;71(1):115-25.



Referencia: Esquema tomado de Vasconcelos et al., Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000 Sep-Oct; 95(5):721-8.

ANEXO Nº 5 : Protocolo de Electroforesis en Geles de Agarosa

Objetivo

Separación de los fragmentos de distinto tamaño de ADN en un gel de agarosa, en el que dichos fragmentos migraran a diferente velocidad según su peso molecular al ser sometidos a una corriente eléctrica.

Material

1. Agarosa grado analítico (Biorad)
2. Tampón TAE, Solución stock concentrada (por litro) 50x:
 - Tris base 242g
 - Ácido acético glacial 57.1mL
 - EDTA (pH 8.0) 0.5M 100mL
3. Buffer de carga de muestra 6x:
 - Orange G 0.25%
 - Glicerol 30% en H₂O
4. Marcadores de peso molecular de 100 y 123 bp
5. Soluciones de Bromuro de etidio (10 mg/mL)

Método

La concentración del gel de agarosa depende del tamaño de los fragmentos de ADN a separar, siendo la concentración mínima el 0.7% (fragmentos grandes de varias Kb) y la máxima el 4% (fragmentos de 50-150 pb). Se pesa 1gr de agarosa por tanto por ciento y por 100 mL de volumen de gel.

Mezclar la muestra con el tampón de carga, el volumen de muestra depende del tamaño de peine con el que se han hecho los pocillos en el gel de agarosa, normalmente es de 10-30 mL. De tampón de carga se añade 1/6 del volumen de muestra.

Introducir el gel de agarosa en la cubeta de electroforesis con el tampón TAE y hacer pasar una corriente de 10 V/cm de gel. Se deja el tiempo necesario para que el frente migre hasta el final del gel. Después se tiñe el gel en las soluciones de etidio (10 mg/mL) durante 10 a 15 minutos, luego pasamos el gel a una cubeta de agua para retirar el exceso (2'), finalmente observamos las bandas con luz UV y se registra la imagen en el lector Geldoc® BIORAD

ANEXO N°6: Clasificación de los Estudios de Eficacia *in vivo* según
Definiciones Tradicionales de Respuesta Parasitológica

La respuesta parasitológica se basa únicamente en el cambio en la densidad parasitaria en el paciente como respuesta a una dosis estándar de un medicamento antimalárico. Las gotas gruesas se tomarán los días 2,3,7,14,21, y 28 así como cualquier otro día en que el paciente presente fiebre. La respuesta parasitológica se categoriza empleando el siguiente esquema:

RIII :una densidad parasitaria del Día 2 que es $\geq 25\%$ de la densidad parasitaria del Día 0

RII : una gota gruesa positiva el Día 2 con una densidad parasitaria que es $< 25\%$ de la densidad del Día 0 y una gota gruesa de sangre positiva del Día 7.

RI Temprana: una gota gruesa negativa del Día 2 con una gota gruesa positiva en cualquier día entre el Día 3 y Día 14.

o

Una gota gruesa negativa en cualquier día entre el Día 2 y el Día 6 inclusive con una gota gruesa positiva en cualquier día entre el Día 7 y el Día 14.

o

Una gota gruesa positiva el Día 2 con una densidad de parásitos asexuados y el Día 6 inclusive con una gota gruesa positiva en cualquier Día entre el Día 7 y el Día 14

RI Tardía :una gota gruesa negativa en el Día 2 o una densidad parasitaria asexual que es $\leq 25\%$ de la densidad del Día 0 y gotas gruesas negativas en cada examen de seguimiento entre el Día 7 y el 14 y una gota gruesa positiva cualquiera de los días entre el Día 15 y el Día 28 inclusive.

Sensible : Una gota gruesa negativa el Día 2 o una densidad parasitaria asexual que es $\leq 25\%$ de la densidad parasitaria asexual del Día 0 y gotas gruesas negativas entre el Día 7 y el Día 28 inclusive.

ANEXO N° 7 : Clasificación de los Estudios de Eficacia *in vivo* según
Determinación de Resultados Clínicos

La evaluación de eficacia o falta de la misma de los medicamentos que están siendo estudiados se basará en una medición de los siguientes resultados clínicos y parasitológicos:

Fracaso Terapéutico Precoz (FTP):

Desarrollo de signos de peligro o malaria grave los Días 1, 2 o 3 en presencia de parásitos asexuados.

o

Densidad parasitaria del Día 2 > densidad parasitaria del Día 0 sin tener en cuenta la presencia de fiebre.

o

Densidad parasitaria del Día 3 \geq 25% de la densidad parasitaria del Día 0.

Presencia de parásitos asexuados del Día 3 con temperatura axilar mayor de 37.5 °C.

Fracaso al Tratamiento Tardío (FTT)

Fracaso Clínico Tardío (FCT):

Desarrollo de signos de peligro o malaria grave el Día 4 o posteriormente con presencia de parasitemia, sin haber reunido previamente los criterios de FTP.

o

Aparición de parasitemia con una temperatura axilar > de 37.5°C (o historia de fiebre) entre los Días 4, 14 y 28 inclusive, sin haber reunido previamente los criterios de FTP.

Fracaso Parasitológico Tardío (FPT):

Presencia de parasitemia con una temperatura axilar de 37.5°C durante los Días 7 y 28 inclusive, sin haber reunido anteriormente los criterios de FTP o FCT.

Respuesta Clínica y Parasitológica Adecuada (RCPA)

Ausencia de parasitemia el Día 14, 21 y 28 sin haber reunido previamente los criterios de FTP, FCT o FPT.

Fuente: Assessment and Monitoring Of Antimalarial Drug Efficacy for The Treatment Of Uncomplicated Falciparum Malaria, Documento Técnico OMS, 2003, pag. 22

ANEXO N° 8 Consentimiento Voluntario Escrito (Español) para el protocolo de Malaria Resistente a Drogas en el Perú. Protocolo # 719. (Versión) con fecha 3 de Diciembre de 1998

1. Este proyecto de investigación tiene el título de Evaluación de la eficacia terapéutica de las drogas antimaláricas para el tratamiento de la malaria no complicada por *Plasmodium falciparum* en las Américas. El proyecto está siendo conducido en el Perú bajo la dirección del investigador principal, el Dr. Alan J. Magill M.D LTC EEUU y el Dr. Alejandro Ilanos, decano de la escuela de salud pública de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) en Lima, Perú. El estudio será conducido con la colaboración del ministerio de salud del Perú (MINSA) tanto local como regional.
2. Me están solicitando que sea voluntario para un proyecto de investigación que verá cuán bien están funcionando las drogas que actualmente están siendo utilizadas para el tratamiento de la malaria en el Perú. Los científicos que están conduciendo este estudio quieren determinar si estas drogas todavía están siendo efectivas en esta área. He sido informado por los investigadores que yo seré uno de los aproximadamente 50 pacientes voluntarios enrolados para el estudio en esta región mi participación en el estudio incluirá tomar las drogas, donar una muestra de sangre, y regresar a la clínica en por lo menos 8 ocasiones durante 14 días.
3. El procedimiento para este estudio me ha sido explicado de la siguiente manera: yo seré entrevistado por un médico del estudio, quien me preguntará acerca de mi historia pasada y mi enfermedad actual. El equipo médico de la clínica examinará mi sangre para buscar malaria, lo mismo que se haría si no estuviera participando en el estudio. Si completo los criterios de inclusión y exclusión para el estudio, me solicitarán participar. Tomaré las drogas que los doctores me den para curar mi malaria, vendré a la clínica en por lo menos ocho (8) ocasiones para el seguimiento.
4. Entre diez (10) y quince (15) mililitros de sangre, aproximadamente 2 a 3 cucharadas, serán extraídas de una vena de mi brazo con una aguja cuando me incluya en el estudio. La extracción de sangre será hecha por una persona experimentada que es miembro del Instituto Médico de Investigación de la Marina de EEUU (US NAMRID), Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) o el MINSA, quienes están conduciendo el estudio.
5. No hay riesgo alguno para mí o para mis hijos en participar en este estudio, aparte del malestar de tener una punción con aguja. Mi brazo será limpiado con alcohol, y nuevas agujas estériles serán utilizadas, para que la posibilidad de infección sea mínima. Si yo me desmayo, recibiré tratamiento médico y seré observado hasta que me sienta mejor. Participar en este estudio me beneficiará, ya que me observarán de cerca por los próximos 28 días. Si continuo teniendo malaria, recibiré un tratamiento alternativo para que me cure de mi enfermedad. Siempre habrá alguien en el centro de salud, así que aun en los días entre las visitas programadas e incluso en los fines de semana yo puedo venir para una revisión si me siento mal. La información acerca de mi enfermedad la compartiré con los médicos que me estén tratando para tratar de mejorar la exactitud del diagnóstico y eficacia terapéutica a la que tenga acceso. Además recibiré una pequeña provisión de comida o merienda, como todos los otros participantes. No hay costo para mí por participar en este estudio.
6. Si tengo cualquier tipo de preguntas en cuanto a mi participación en este estudio de investigación, puedo contactar al representante local del MINSA, cualquier personal del estudio o el Dr. Alan Magill del US NAMRID al 01-5612733/015613043. Si tengo preguntas acerca de mis derechos como participante en este estudio, puedo dirigir las al Dr. Pedro Legua el monitor médico del UPCH.
7. Entiendo que mi participación en este estudio es voluntaria y si decido no participar eso no perjudicará ni interferirá con mi atención médica y tratamiento.
8. Entiendo que el equipo médico del centro de salud es responsable de los exámenes de laboratorio que le harán a mi muestra de sangre para determinar mi diagnóstico. Como paciente, mi propio médico será responsable de mi cuidado y mi tratamiento. Los

laboratorios del US NAMRID o del Instituto de Investigación del Ejército Walter Reed (WRAIR) en los EEUU o los designados serán responsables de los exámenes que se realizarán a mi muestra, pero los resultados de su investigación no se usarán para guiar mi cuidado.

9. Los inspectores médicos y del gobierno de tanto los EEUU como del Perú que estén supervisando para estar seguros de que este estudio sea hecho de manera segura, legal y aprobada, pueden inspeccionar directamente los formatos que incluyan información acerca de mí, e información sobre los resultados de mis pruebas. Los representantes del comando del Ejército de los EEUU y de investigación Médica de Materiales pueden revisar los registros de la investigación como parte de su responsabilidad para proteger a los sujetos humanos del estudio. Yo autorizo dicha inspección. Sin embargo, en todas las publicaciones, reportes y presentaciones que sean resultado de este proyecto de investigación, mi nombre no será utilizado.
10. A pesar de que no se me notificara sobre los resultados del estudio, los oficiales del MINSA recibirán un reporte de los resultados cuando el estudio este completado. Entiendo que los investigadores que conducen el estudio desean publicar los resultados en revistas médicas.
11. La copia original de este consentimiento será retenida por el investigador principal.
12. Certifico que he recibido una copia de este consentimiento y entiendo que el hecho de firmar este formato verifica mi deseo de voluntariamente participar en este estudio.

Adulto(18 años cumplidos o mayor): Si () No ()

Firma del Voluntario _____ Fecha _____

Nombre del Voluntario _____
Apellido Paterno Apellido Materno Nombre

Firma del Testigo _____ Fecha _____

Niño o menor(Menor de 18 años): Si () No ()

Firma del Padre o Apoderado _____ Fecha _____

Nombre del Padre o Apoderado _____
Apellido Paterno Apellido Materno Nombre

Firma del Investigador _____ Fecha _____